UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Doença diarreica aguda em João Pessoa: prevalência
de enteropatógenos e importância dos potenciais
fatores de risco e proteção**

Antônio Fernandes Filho

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientadora:
Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2004

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Fernandes Filho, Antônio
F363d Doença diarréica aguda em João Pessoa : prevalência de
enteropatógenos e importância dos potenciais fatores de
risco e proteção / Antônio Fernandes Filho. -- São Paulo,
2004.
109p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Martinez, Marina Baquerizo

1. Microbiologia médica 2. Microbiologia clínica
3. Epidemiologia : Saúde pública 4. Parasitologia médica I. T.
II. Martinez, Marina Baquerizo, orientador.

616.01 CDD

Antônio Fernandes Filho

**Doença diarréica aguda em João Pessoa: prevalência
de enteropatógenos e importância dos potenciais
fatores de risco e proteção**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 07 julho de 2004.

Às crianças pobres do Nordeste do Brasil, que ainda sofrem com os males e agravos da doença diarréica e demonstram, através do olhar triste e inocente, as condições precárias em que vivem. Em especial àquelas que participaram dessa pesquisa e possibilitaram o conhecimento, à luz da ciência, sobre a Diarréia aguda em nossa região. Dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Deus,

A quem ousou chamar de Pai, que me dá ânimo, fortifica minha fé, renova minhas forças, escuta minhas preces, compreende e perdoa minhas fraquezas. Minha devoção e gratidão pela vida!

Meus pais,

Antônio Fernandes, homem e pai admirável. Jamais esquecido! Meu maior mestre, que despertou em mim o interesse pelas Ciências Farmacêuticas. Sua presença é tão forte em minha vida, que mesmo sem vê-lo, sinto que está comigo, a me guiar e proteger.

Ivonilde Duarte, minha Mãe, pelo amor infinito e incondicional, por fazer de minhas angústias e alegrias as suas próprias. Por dividir comigo sorrisos, choros e sonhos. Minha eterna gratidão!

Minha família,

Manoel Fernandes, irmão mais velho que muitas vezes assumiu o papel de pai, pelo apoio e firmeza nos momentos difíceis, quando foi forte o desejo de desistir. E por tudo que você incondicionalmente faz por mim, muito obrigado! Essa vitória também é sua!

Meu irmão Agostinho, por ser o mano-amigo certo das horas incertas, pela ajuda e palavras de incentivo, meu obrigado!

Demais irmãos Vécia, Verusa e Daniel pelo amor e apoio que sempre recebi de vocês; meus cunhados, sobrinhos, tios, minha prima Vescijudith, e demais familiares, inclusive minha querida Consola. Obrigado pela compreensão, ajuda, carinho e apoio nas horas de dúvida e desânimo. Divido com todos vocês as alegrias por essa conquista.

Minha noiva,

Maria, sem você nada teria sentido! Obrigado por fazer dos momentos de saudade motivo de incentivo para enfrentar os obstáculos. Pelo teu amor e presença em minha vida, meu obrigado. Amo-te!

Minha Orientadora,

Profa. Marina B. Martinez, que muito me honrou ao aceitar ser minha orientadora. Sua participação incansável em todas as fases deste estudo, com sugestões precisas, questionamentos ponderados e exigindo sempre o melhor, sem nunca deixar de apontar caminhos, trouxe-me segurança necessária para enfrentar este desafio. Ter você como orientadora foi um constante aprendizado. Obrigado por sua confiança!

Minha estagiária, Liana Montemor

Essa conquista também é sua! Pela imensa ajuda prestada no decorrer de seu estágio. Pela alegria cativante que enchia de graça nosso laboratório e tornava menos cansativo o labor da pesquisa. Meu muito obrigado!

Aos colaboradores

Dra. Sônia Ramos, sem dúvida sua colaboração, principalmente com relação ao enfoque epidemiológico e o desenho do estudo caso-controle, foi de extrema importância. Obrigado pela disponibilidade, pela atenção e orientação prestada. Serei sempre grato!

Dra. Tânia Tardeli do Amaral Gomes, por toda contribuição nos ensaios de adesão, nos testes de hibridação e por toda disponibilidade que sempre teve para comigo, meus agradecimentos!

Dra. Mônica Aparecida M. Vieira, pela contribuição nos testes de hibridização, minha eterna gratidão!

Dra. Kinue Irino, Dra. Tânia Mara e Maria Aidê , da sessão de enterobactéria do Instituto Adolfo Lutz, obrigado pela realização da sorotipagem e por toda colaboração prestada.

Dra. Tânia Tanaka, pela colaboração no início dos trabalhos de hibridação, meus agradecimentos!

Prof. Dr. Lauro Santos Filho, do Núcleo de Medicina Tropical - UFPB, sem seu apoio dificilmente alcançaríamos esses resultados. Obrigado pela acolhida, pelo incentivo e colaboração e por se colocar sempre a disposição a qualquer tempo. Meus agradecimentos!

Aos Técnicos do Núcleo de Medicina Tropical - UFPB, Gilmar e Soloniza, essa vitória também é de vocês, que não pouparam esforços para que conseguíssemos realizar um excelente trabalho. Muito obrigado por tudo, pela colaboração e pela amizade que ficou e jamais será esquecida.

Ao corpo clínico do Complexo de Pediatria Arlinda Marques, em especial a Dra. Darcy Lucena (superintendente), pelo apoio prestado no início dos trabalhos. Dra. Maria do Socorro Andriano de Oliveira e Dra. Fabiana Baldas, participantes ativas na coleta de dados e amostras, sem vocês tudo seria mais difícil. Muito obrigado! Enfermeira Ronilda, que colaborou bastante na seleção dos casos e controles, prestando um excelente trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Nicéa, Bel e Totó.

Que acompanharam o desenrolar das atividades, incentivando-me sempre e apoiando-me, desde o princípio de minha pós-graduação. Agradeço a força da "torcida organizada". Jamais esquecerei do acolhimento e amizade que recebi de vocês, que representam para mim uma segunda família.

Amigos

Aos colegas e Pós-graduandos do Laboratório de Virulência bacteriana, Andréa, Carla, Carol, Juliana, José Antonio e a estagiária Vanessa. Cada um de vocês teve uma participação neste trabalho, ora contribuindo com alguma de suas etapas, ora servindo como interlocutores das histórias da Paraíba que de certa forma diminuía a saudade da terrinha. Pela grande amizade que ficou (e não será esquecida), carinho, ajuda e compreensão, muito obrigado!

Aos colegas do Laboratório de Resistência bacteriana, John McCulloch, pelo grande amigo que passou a ser, pelos momentos de descontração no Duoeto (sem futuro!) com toda turma do laboratório e pelos comentários oportunos que só os verdadeiros amigos compreendem e a Cristina Reinert, pela amizade, conselhos e irmandade que se criou a partir de nossa amizade, só posso agradecer! e demais colegas Nilton Lincopan, Marcos Vianello, Diogo Ogawa, Ana Paula, obrigado pela amizade e momentos de descontração!

A Profa. Elsa Mamizuka, obrigado pela amizade, consideração e ensinamentos ao longo da Pós-graduação.

Aos colegas de Laboratório de Microbiologia do LAC-FCF, Renata Albuquerque e Solange, obrigado pela amizade e momentos compartilhados que ficaram em minha memória.

As Professoras Primavera Borelli e Silvia Berlanga, sou grato por permitirem o uso do laboratório e equipamentos durante os ensaios de adesão celular

Às secretárias Márcia, Suely, Dora e Ana, muito obrigado por toda ajuda prestada, pelo carinho e atenção que sempre tiveram comigo. Muito obrigado!

Ào pessoal da Secretaria de Pós-graduação, Jorge e Elaine, Obrigado pela disponibilidade e atenção. Serei sempre grato!

Às auxiliares da limpeza, Dorley, Carmem, Cláudia e Rose, pelo carinho e respeito a mim dedicado. Muito obrigado!

Aos amigos da Paraíba, Dr. Luciano Nóbrega e Tio Osvaldo, pelos momentos de descontração, amizade verdadeira e consideração. Muito obrigado!

À CAPES, pela bolsa de doutorado concedida, meus agradecimentos!

À CNPQ e FAPESP, pelo apoio financeiro concedido para a realização desta pesquisa, meus agradecimentos!

À Universidade de São Paulo, fonte inesgotável de saber, meus agradecimentos!

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meus agradecimentos!

LISTA DE ABREVIações

H antígeno flagelar

O antígeno somático

CAMPY *Campylobacter sp*

CT toxina colérica

DAEC *Escherichia coli* que adere difusamente ("diffusely adhering *Escherichia coli*")

DNA ácido desoxirribonucléico

E. coli *Escherichia coli*

EAEC *Escherichia coli* enteroagregativa ("enteroaggregative *Escherichia coli*")

EAST toxina produzida por cepas de *E. coli* enteriagregativa ("EA_{agg}EC heat-stable enterotoxin")

EDTA ácido etileno diamino tetra-acético

EHEC *Escherichia coli* enterohemorrágica ("enterohemorrhagic *Escherichia coli*")

EIEC *Escherichia coli* enteroinvasora ("enteroinvasive *Escherichia coli*")

EPEC *Escherichia coli* enteropatogênica ("enteropathogenic *Escherichia coli*")

ETEC *Escherichia coli* enterotoxigênica ("enterotoxigenic *Escherichia coli*")

H- não móvel

LTI toxina termo-lábil I ("labile toxin")

PARAS parasitas

PCR *polymarese chain reaction*

rpm rotações por minuto

SALMO *Salmonella sp*

SHIG *Shigella sp*

STh toxina termo estável

STp toxina termo estável

STxI toxina de Shiga variante I

STxII - toxina de Shiga variante II

TBE - Trizma-base, borato, EDTA

Tris - tris [hidroximetil] aminometano

TSB - Tryptic Soy Broth

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - graus Celsius

g - aceleração gravitacional

h - hora(s)

HCl - ácido clorídrico

Kb – kilo pares de bases

KCl - cloreto de potássio

MgCl₂ - cloreto de magnésio

min - minuto(s)

mL - mililitro(s)

mM - milimolar

μg/mL - micrograma (s) por mililitro

μL - microlitro(s)

μm - micrometro

μM - micromolar(es)

ng - nanograma(s)

ng/μL - nanograma(s) por microlitro(s)

nm - nanometros

pb – pares de bases

s - segundo(s)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem dos 290 casos e 290 controles com patógeno único, múltiplos patógenos e sem patógenos.....36

Figura 2. Porcentagem de enteropatógenos isolados de crianças com e sem diarreia segundo faixa etária.....40

Figura 3. Porcentagem de enteropatógenos isolados dos 580 pacientes estudados, segundo estação climática..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das crianças estudadas nos grupos diarreico e controle, segundo faixa etária.....	17
Tabela 2. Marcadores de virulência pesquisados na caracterização de <i>E. coli</i> diarreiogênicas.....	27
Tabela 3. Ocorrência de marcadores de virulência pesquisados por sonda em 1238 cepas de <i>E. coli</i> , isoladas de casos, e de 1106 cepas isoladas de grupo controle.....	37
Tabela 4. Padrão de adesão em 111 cepas do grupo diarreic.....	37
Tabela 5. Padrão de adesão em 118 cepas do grupo cotrole.....	38
Tabela 6. Frequência de enteropatógenos em fezes de crianças com e sem diarreia aguda na cidade de João Pessoa - PB.....	39
Tabela 7. Infecções mistas em 290 crianças com diarreia aguda, segundo grupo etário.....	42
Tabela 8. Sinais e sintomas apresentados pelas crianças com diarreia.....	43
Tabela 9. Identificação dos antígenos O e H em cepas de EPEC atípicas.....	44
Tabela 10. Identificação dos antígenos O e H em cepas de EAEC.....	44
Tabela 11. Identificação dos antígenos O e H em cepas de ETEC.....	45
Tabela 12. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo sexo masculino.....	46
Tabela 13. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a creches.....	47

Tabela 14. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a cuidados em outras residências.....47

Tabela 15. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo a permanência apenas na própria casa.....47

Tabela 16. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a + de 3 pessoas no domicílio.....48

Tabela 17. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a até 3 pessoas no domicílio.....48

Tabela 18. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a + 3 no dormitório.....48

Tabela 19. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a até 3 pessoas no dormitório.....49

Tabela 20. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a renda mensal.....49

Tabela 21. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a animais domésticos.....50

Tabela 22. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição a água fervida.....50

Tabela 23. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição ~~ao~~ ao leite materno nos maiores de 1 ano.....51

Tabela 24. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição ao leite ~~materno~~ materno nos menores de 1 ano..... 51

Tabela 25. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição ao leite de cabra..... 52

Tabela 26. Análise dos fatores risco e proteção para doença diarreica aguda segundo exposição ao leite em pó..... 52

RESUMO

Para determinar a prevalência e epidemiologia dos enteropatógenos bacterianos e parasitários na diarreia aguda infantil, foram estudadas 290 crianças menores de 24 meses com diarreia e 290 crianças controles, que procuraram o serviço de emergência do Hospital Infantil Arlinda Marques em João Pessoa, Nordeste do Brasil. Enteropatógenos foram identificados em 78,2% dos casos e em 12,4% dos controles; *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) foi o patógeno mais freqüente sendo detectada em 25% dos casos e em 8,3% dos controles; seguida por *E. coli* enteropatogênica (EPEC) em 11% dos casos (dos quais 9,3% foram cepas atípicas) e em 0,3% dos controles; *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC) em 10% dos casos e 2,8% dos controles; *Salmonella* sp em 7,9% dos casos; *Shigella* sp em 4,1% dos casos; *E. coli* enteroinvasora (EIEC) em 1,7% dos casos; *Campylobacter* sp em 2,4% dos casos e enteroparasitas foram detectados em 15,5% dos casos e 1,0% dos controles. Infecções mistas foram verificadas em 32 (11%) casos e em apenas 1 (0,3%) controle. A faixa etária mais atingida foi a dos menores de um ano e as associações mais frequentes ocorreram entre EAEC + *Salmonella* e EAEC + EPEC atípica. Neste estudo foram identificados fatores de risco associados com episódios de diarreia em crianças de acordo com o agente etiológico bacteriano. As análises estatísticas demonstram uma importante associação de EAEC com diarreia aguda infantil em João Pessoa, Brasil, sendo a ingestão de leite de vaca em pó e a exposição a aglomerados e creche os fatores de risco mais associados a diarreia causada por EAEC.

ABSTRACT

In order to determine the prevalence and epidemiology of enteropathogens in acute infantile diarrhoea, 290 infants younger than 24 months of age with diarrhoea and 290 age-matched control subjects who came to ER of the Hospital Infantil Arlinda Marques in João Pessoa, Northeastern of Brazil were studied. Enteropathogens were identified in 78,2% of case infants and 12,4% of controls. Enteroagregative *Escherichia coli* (EAEC) was the most frequently found pathogen and was detected in 25,0% of cases and 8,3% of controls. The second most frequent pathogen was Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), in 11,0% of cases and 0,3% of controls, followed by Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in 10% of cases and 2,7% of controls; *Salmonella* sp was found in 7,9% of cases, *Shigella* sp in 4,1% of cases, Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) in 1,7% of cases and *Campylobacter* sp in 2,4% of cases. Enteroparasites were detected in 15,5% of cases and 1,0% of controls. Mixed infections (more than one pathogen) were found in 32 (11%) of cases and in only 1 (0,3%) control. The most affected age group was of those smaller than 1 year of age and the most frequent associations were of EAEC + *Salmonella* e EAEC + atypical EPEC. In this study risk factors associated with episodes of diarrhoea among infants by bacterial etiological pathogens were identified. Statistical analysis demonstrated a significant association of Enteroagregative *E. coli* (EAEC) with acute infantile diarrhoea in João Pessoa, Brazil. The risk factors most strongly associated diarrhoea caused by EAEC were the ingestion of powdered cow milk and exposure to crowds and day care centres.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos específicos.....	16
3. Casuística e métodos.....	18
3.1. Localização do estudo.....	18
3.2. Desenho do estudo.....	19
3.2.1. Estudo caso-controle.....	19
3.2.2. Critério de exclusão.....	20
3.2.3. Método empregado para coleta de dados.....	20
3.2.4. Variáveis do estudo.....	20
3.3. Dados clínicos e epidemiológicos.....	21
3.4. Definições.....	21
3.4.1. Sexo do paciente.....	21
3.4.2. Exposição a diferentes formas de cuidado.....	21
3.4.2.1. Creche.....	21
3.4.2.2. Outra residência.....	22
3.4.2.3. Permanência apenas em casa.....	22
3.4.2.4. Outras situações.....	22
3.4.3. Números de pessoas que moravam no domicílio.....	22
3.4.4. Aglomeração.....	22
3.4.5. Exposição a animais.....	22
3.4.6. Condições sócio-econômicas.....	22
3.4.7. Fonte de água.....	23
3.4.8. Tipo de Leite.....	23
3.5. Metodologia.....	23
3.5.1. Coleta e transporte de material.....	23
3.5.2. Isolamento de enteropatógenos bacterianos a partir de fezes.....	24
3.5.3. Identificação.....	24
3.5.4. Identificação bioquímica de colônias suspeitas.....	25
3.5.5. Triagem sorológica de colônias suspeitas.....	26
3.5.6. Pesquisa de seqüências gênicas relacionadas aos fatores de virulência de <i>E. coli</i>	26
3.5.6.1. Preparo dos filtros.....	27
3.5.6.2. Marcação radioativa das sondas.....	28
3.5.6.3. Reação de hibridização de DNA.....	28
3.5.7. Identificação do sorotipo de cepas de <i>E. coli</i> pertencentes a sorogrupos de EPEC, ETEC, EAEC e IEC.....	30
3.5.8. Pesquisa de invasividade.....	30
3.5.9. Teste de adesão bacteriana às células HEp-2.....	31
3.5.9.1. Cultivo das células HEp-2.....	32
3.5.9.2. Preparo das amostras bacterianas.....	32

3.5.9.3. Realização do teste de adesão.....	32
3.5.10. Pesquisa de parasitas intestinais.....	34
3.5.11. Análise estatística.....	34
3.5.11.1. Análise da prevalência dos enteropatógenos.....	35
3.5.11.2. Análise dos potenciais fatores de risco e proteção.....	35
4. Resultados	
4.1. Frequência de isolamento de enteropatógenos nos grupos diarréico e controle.....	37
4.2. Pesquisa de marcadores de virulência.....	38
4.3. Teste de adesão em células HEp-2.....	39
4.4. Prevalência de enteropatógenos nos casos e controles.....	40
4.5. Isolamento de enteropatógenos segundo grupo etário.....	41
4.6. Isolamento de enteropatógenos segundo estação climática.....	42
4.7. Infecções mistas.....	43
4.8. Quadro clínico.....	44
4.9. Sorotipagem dos antígenos O e H de <i>E. coli</i>	45
4.10. Análise dos fatores de risco e proteção.....	47
5. Discussão.....	55
6. Conclusão.....	78
7. Referências bibliográficas.....	80
8. Anexos.....	95

1. INTRODUÇÃO

Segundo Plevris e Hayes (1996), a conjunção de **dia**, que significa direto, sem interrupção, com **roia**, que significa escoar, fluir, derramar, escorrer; formam a palavra, derivada do grego, **diarréia**, que classicamente é conceituada como alteração do hábito intestinal, caracterizada pelo aumento do número de evacuações e/ou diminuição da consistência das fezes, de etiologia presumivelmente infecciosa, evolução autolimitada e com duração não superior a 14 dias (TOPOROVSKI *et al*, 1999; FAGUNDES-NETO & PENNA, 1991).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), define diarréia aguda como alteração repentina do hábito intestinal, caracterizada pela ocorrência de três ou mais evacuações líquidas em 24 horas ou uma única semilíquida contendo muco e/ou sangue em 12 horas, cuja duração total não excede o período de 15 dias. As manifestações clínicas podem variar de discretas a extremamente graves, podendo levar a óbito (CAMPOS, 1995).

A diarréia aguda ainda constitui importante causa de morbidade e mortalidade infantil, sobretudo em países em desenvolvimento (ANANTHAN *et al*, 1989; FAGUNDES-NETO *et al.*, 1989). Em 1992, Bern *et al.*, estimaram a ocorrência anual de três milhões de mortes por diarréia no mundo. Após uma década, em 2002, OMS observou uma redução no índice de mortalidade, estimada em 2 milhões de mortes por ano, porém a morbidade por diarréia permaneceu praticamente a mesma (2,6 episódios por criança/ano).

Lactentes e crianças são os indivíduos mais vulneráveis, pois necessitam, relativamente, de maiores requerimentos hidroeletrólíticos e nutricionais para seu crescimento, assim como apresenta menor capacidade de defesa (GUERRANT, 1990).

Nos países em desenvolvimento, crianças abaixo de três anos de idade podem ter 10 episódios de diarreia por ano, muito embora os níveis médios mais freqüentes situam-se geralmente entre 3 e 4 (WHO, 1988).

No Brasil temos um alto índice de pobreza absoluta e elevada taxa de desnutrição e diarreia, o que aumenta a taxa de mortalidade neste país (CAMPOS, 1995). Dados do Ministério da Saúde demonstraram que, em 1999, ocorreram 4.487 óbitos de crianças menores de 5 anos devido à diarreia. Em 1996, foram registradas 356.045 internações por diarreia aguda em menores de 5 anos, que representaram 20,9% de todas as internações nesta faixa etária, sendo que 53,5% destas internações foram de crianças menores de 1 ano de idade.

Na região Nordeste o risco é 4 a 5 vezes maior que na região sul, chegando a representar 30% das mortes no primeiro ano de vida. Na Paraíba, 6,3% das mortes em menores de cinco anos foram atribuídas à diarreia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

Embora a diarreia aguda tenha maior impacto nas regiões mais pobres dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, é importante ressaltar que a mesma, ainda é considerada importante problema pediátrico em países desenvolvidos e industrializados. Nos Estados Unidos da América, por exemplo, estima-se que cerca de 220 mil crianças menores de 5 anos de idade

sejam hospitalizadas anualmente em consequência de diarreia. Nesse país, a mortalidade por diarreia atinge 300 crianças por ano (PRATICE, 1996).

Atualmente, a diarreia no mundo é a segunda causa de morte nessa faixa etária, o que corresponde a 19% da mortalidade geral (WHO, 2004), sendo superada apenas pelas doenças respiratórias agudas (WHO, 2004; VICTORIA, 1994).

A maioria dos enteropatógenos encontrados em países desenvolvidos também está presente em países em desenvolvimento, porém a incidência de seus achados e de doenças diarreicas causadas pelos mesmos, varia grandemente, de acordo com a região e a população estudada. Em países desenvolvidos, por exemplo, há predomínio da etiologia viral (BARLOW *et al.*, 1999; CAPRIOLI *et al.*, 1996), enquanto que a etiologia bacteriana assume papel importante em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias são mais desfavoráveis (BRUNSER *et al.*, 1997; GRACEY, 1996; NATARO *et al.*, 1996).

Os estudos etiológicos e epidemiológicos em áreas com maior frequência de doença diarreica revelam que os agentes infecciosos bacterianos mais comuns são: *Escherichia coli* de linhagens diarreiogênicas, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Campylobacter jejuni* e em países de clima frio *Yersinia enterocolitica* e *Aeromonas*. Estes agentes podem exercer sua ação patogênica através dos seguintes mecanismos: produção de enterotoxinas; produção de citotoxinas; adesão ou aderência e ou invasão (FARTHING, 1997; SNYDER, 1996).

O gênero *Campylobacter* (do grego: *Kampylos*, encurvado; *bacter*, bactéria) é constituído de várias espécies de natureza zoonótica. São móveis

por flagelação monopolar ou bipolar monotríquia. São microaerófilos estritos, precisando de 5-6% de O₂ para proliferar (FAGUNDES-NETO & PENNA, 1995). Atuam basicamente por mecanismo de invasão, comprometendo principalmente o intestino grosso, levando a quadros diarreicos associados à sangue ou pus, muco, presença ou não de febre, tenesmo e dor à defecação (FAGUNDES-NETO & PENNA, 1995). No Brasil, alguns trabalhos relataram isolamentos de *Campylobacter* a partir de fezes de crianças com diarreia, com frequências variando entre 6,4% e 13,9% (PAVAN, 1991; FERNANDEZ, 1984; GONZALES, 1984).

O gênero *Shigella* foi descrito pela primeira vez por Shiga em 1898, como causa de uma epidemia severa da chamada "disenteria bacilar" (TRABULSI, 1981). É constituído de quatro espécies, designadas *S. dysenteriae* (grupo A); *S. flexneri* (grupo B); *S. boydii* (grupo C) e *S. sonnei* (grupo D). Os sorotipos de *Shigella* são caracterizados somente pelos antígenos O, uma vez que estas bactérias são desprovidas de antígenos K e H (SNYDER, 1996). A doença humana causada por *Shigella* é chamada shigelose ou disenteria bacilar, sendo que todos os sorotipos envolvidos são patogênicos. É freqüentemente adquirida por ingestão de água contaminada com fezes humanas ou de alimentos lavados com água contaminada. Embora a disenteria seja normalmente uma doença autolimitada em adultos, ela pode ser fatal em crianças e jovens, sendo a principal *causa mortis* em países onde a doença é endêmica (SALYERS, 1994). *Shigella* também apresenta o mecanismo invasor, proliferando dentro da célula epitelial, determinando processo inflamatório e ulcerações na mucosa. A invasão e a multiplicação no interior da mucosa são essenciais para o desenvolvimento da lesão morfológica e o defeito no

transporte de água e eletrólitos que resulta no processo diarreico (FARTING, 1997; SNYDER, 1996). A capacidade invasora desta bactéria pode ser comprovada pelo Teste de Serény (causando ceratoconjuntivite em animais de laboratório) e por ensaios em culturas de tecidos (FARTING, 1997; SNYDER, 1996; SERENY, 1963). Estudos epidemiológicos realizados no Brasil relatam percentuais significantes desta enterobactéria em fezes diarreicas de crianças (SCALETISKY *et al*, 2002; ORLANDI *et al*, 2001; ALMEIDA *et al*, 1998; GOMES *et al*, 1991).

Um outro agente etiológico de diarreia em seres humanos é a enterobactéria *Salmonella*, que ao penetrar na célula da mucosa intestinal, atravessa o epitélio para se localizar na lâmina própria, onde causa microabcessos e prolifera dentro dos macrófagos, sendo assim transportada por estas células, desencadeando processos infecciosos à distância (FARTING, 1997; SNYDER, 1996; FAGUNDES-NETO & PENNA, 1991). A classificação e a nomenclatura das salmonelas sofreram várias modificações nos últimos anos e ainda não estão totalmente definidas. Na rotina utiliza-se um esquema de identificação denominado, esquema de Kauffmann & White, que divide o gênero em tipos sorológicos (sorotipos ou sorovares), tendo por base a composição antigênica das salmonelas com relação aos seus antígenos O, H e Vi (capsular). Este agente foi isolado em diversos trabalhos nacionais com percentuais variando de 0,4% a 7,6% (SCALETISKY *et al*, 2002; ORLANDI *et al*, 2001; ALMEIDA *et al*, 1998; GOMES *et al*, 1991).

Yersinia enterocolitica pode causar diferentes tipos de infecções no homem, sendo a infecção intestinal a mais importante (GIRARDI, 1999). Os sintomas de infecção por *Y. enterocolitica* variam de uma forma branda da

doença, caracterizada por diarreia e dor abdominal, a uma forma severa caracterizada por febre e dor abdominal tão aguda que se confunde com apendicite (SALYERS, 1994). Seu mecanismo de ação assemelha-se ao da *Salmonella* (BRUNSER, 1997; FAGUNDES-NETO & PENNA, 1996). Estudos nacionais revelam pouca positividade, e, portanto, baixa relação com processos diarreicos (SOUZA *et al*, 2002; ORLANDI *et al*, 2001; ALMEIDA *et al*, 1998; FAGUNDES-NETO, 1995; FAGUNDES-NETO & PENNA, 1991).

Escherichia coli, é um membro da microbiota normal do intestino humano e em geral, não provoca doença. Torna-se patogênica quando atinge tecidos fora do trato intestinal ou outros locais com microbiota pouco freqüente. Quando as defesas normais do hospedeiro estão inadequadas, sobretudo na infância e na velhice, nos estágios terminais de outras doenças, após imunossupressão ou quando se utilizam demoradamente cateteres uretrais ou venosos, podem ocorrer infecções clinicamente importantes (NATARO & KAPER, 1998).

Com relação às infecções intestinais, são classificadas em seis categorias, conhecidas como *Escherichia coli* diarreiogênicas (NATARO & KAPER, 1998) : *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e a *E. coli* que adere difusamente (DAEC).

EIEC divide com *Shigella* uma similaridade biológica, morfológica e funcional. Este grupo de microrganismo infecta o íleo terminal e o cólon, onde invade as células epiteliais e se multiplica no seu interior. Durante o processo invasor, ocorre uma reação inflamatória de intensidade variável, levando a um quadro de disenteria semelhante ao da *Shigella*. Não são agentes muito

freqüentes, principalmente, em crianças abaixo de um ano de idade (SOUZA *et al*, 2002; ORLAND *et al*, 2001; ALMEIDA *et al*, 1998; BRUNSER *et al*, 1997; SNYDER, 1996; FAGUNDES-NETO, 1991; LEVINE, 1987). Igualmente a *Shigella*, amostras de EIEC também causam ceratoconjuntivite em cobaias.

E. coli produtora de toxina de Shiga é uma importante causa de diarreia em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Esta categoria está associada à produção de toxinas denominadas de toxina de Shiga (STx) 1 e 2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) constitui-se um grupo de amostras dentro da categoria de STEC. Podem causar lesão do tipo *attachment and effacement*, semelhante a EPEC, e estão estreitamente relacionadas a quadros de colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (NATARO & KAPER, 1998).

ETEC está implicada em casos de diarreia aguda, sendo também uma importante causa da chamada diarreia do viajante. A principal característica desta categoria é a capacidade de produzir isolada ou simultaneamente, dois tipos de enterotoxinas: LT (termolábil) e ST (termoestável) (LEVINE, 1987). Apesar da ETEC exercer sua ação através da produção de suas enterotoxinas, admiti-se que a mesma necessita, para ser patogênica, produzir os fatores de colonização, que são estruturas de natureza protéica (fimbrias) que envolvem a bactéria e a fixam à mucosa intestinal. Na ausência destas fimbrias, a bactéria não adere à mucosa e, é excretada pelos fluidos e movimentos peristálticos intestinais (NATARO & KAPER, 1998; BRUNSER *et al*, 1997; SNYDER, 1996). Em regiões endêmicas há aumento das infecções nos meses mais quentes e úmidos (LEVINE, 1987). Estudos realizados no Brasil mostram uma prevalência de 23,5% no Ceará (GUERRANT, 1983) e de 13,5% em São Paulo (SOUZA, 2002).

Amostras de EPEC colonizam o intestino delgado onde causam uma lesão característica denominada *attachment and effacement*, caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais, aderência da bactéria à célula epitelial e reorganização do citoesqueleto, o que leva à formação de um pedestal onde a bactéria permanece aderida intimamente (MOON, *et al.*, 1983).

EPEC ainda constitui uma importante causa de diarreia em lactentes, sobretudo nos países em desenvolvimento. Nos estudos do tipo caso-controle realizados nos seis continentes foi sempre encontrado EPEC em mais crianças com diarreia do que nos controles. Trabalhos realizados no México (CRAVIOTO, 1991) e Brasil (FAGUNDES-NETO *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1991; TOLEDO, 1983), por exemplo, mostraram que EPEC era o agente encontrado em 30 a 40% das diarreias em crianças menores de 1 ano. Porém, trabalhos mais recentes observam uma queda nesse percentual. Scaletsky *et al.* (2002), isolou apenas 11,6% de EPEC em crianças menores de 2 anos com diarreia na cidade de Natal - RN, Nordeste do Brasil. Rodrigues *et al.* (2004), também relatam uma redução do percentual de isolamento desse agente em crianças com diarreia na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo.

Em 1984, Scaletsky, Silva, Trabulsi relataram importantes informações para o posterior entendimento da fisiopatogenia da EPEC ao observarem dois distintos padrões de adesão em células HeLa: adesão localizada (AL), onde as bactérias aderiam a determinados sítios celulares, formando microcolônias, e adesão difusa (AD), onde as bactérias recobriam toda a superfície celular de maneira regular ou somente o contorno da célula. Posteriormente, pesquisadores observaram que as cepas que apresentavam padrão de adesão localizada eram mais significativamente associadas à diarreia do que as cepas

que apresentaram padrão AD (SCALETISKY *et al.*, 1985). No mesmo ano, LEVINE *et al.*, demonstraram a existência de uma adesina de origem plasmidial, que seria responsável pela adesão localizada de EPEC e a denominou de Fator de aderência da EPEC (EAF). Outros pesquisadores obtiveram um fragmento a partir do plasmídio, relacionado com a produção de EAF, que foi denominado sonda EAF e utilizado para detecção de genes de virulência semelhantes, em amostras de EPEC, através de técnicas de hibridação de DNA (NATARO *et al.*, 1985).

Em 1987, NATARO *et al.*, estudando *E. coli* isoladas de crianças chilenas com e sem diarreia, através da aderência às células HEp-2 e teste de hibridização de DNA (sonda genética), observaram três padrões distintos de adesão: localizado, difuso e agregativo (AA). Sendo que o último não estava associado à positividade do EAF. Nesse padrão de aderência, os agregados assumem um padrão característico de "tijolos empilhados". Estas cepas foram então denominadas enteroaderenteagregativas, formando um outro padrão de adesão não relacionado com o EAF, que posteriormente seria denominado agregativo e classificando uma outra categoria de *E. coli* diarreiogênica, conhecida como *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Em 1989, Gomes *et al.*, demonstraram que as *E. coli* AL, AD e AA teriam muitas diferenças em seus mecanismos de associação celular, podendo a AD e AA não apresentarem associação com diarreia ou terem diferentes características epidemiológicas.

Scaletsky *et al.*, em 1996, descreveram um novo padrão de aderência da *E. coli* a célula HEp-2, denominado de adesão "localizada-like" (ALL), caracterizada pela presença de microcolônias menos compactas ou

aglomerados de bactérias em poucas células, observadas apenas em períodos de incubação prolongada (6 horas). Este padrão foi observado em cepas de EPEC EAF negativas, e encontradas em lactentes menores de um ano de idade com diarreia aguda ou persistente, com frequência significativa quando comparada com lactentes de grupo controle (SCALETSKY, 1999).

Atualmente, utiliza-se o termo EPEC típica para aquelas cepas A/E (*attachment and effacing*), não produtoras de toxina Shiga, que apresentam o plasmídeo EAF, responsável pela adesão localizada, enquanto que EPEC atípicas seriam aquelas que não possuem o plasmídeo EAF (CLARKE *et al*, 2003; KAPER & NATARO, 1998).

Como mencionado anteriormente, *E. coli* enteroagregativa, EAEC, são amostras de *E. coli* que formam um padrão de adesão agregativo, quando se associam com células HEp-2 ou HeLa, lembrando a disposição de tijolos empilhados. Estudos demonstram que essa categoria pode ser considerada um patógeno emergente (OKEKE & NATARO, 2001; NATARO *et al.*, 1998). Em países em desenvolvimento, foi encontrada associação entre EAEC e diarreia aguda em crianças e adultos (PAUL *et al*, 1994; HAIDER *et al*, 1991). Entretanto, outros estudos epidemiológicos não encontraram tal associação, relatando um considerável número de portadores assintomáticos (SCALETSKY *et al*, 2002; CRAVIOTO *et al.*; KESKIMAKI *et al.*, 2001, 1991; GOMES *et al.*, 1989). No Brasil, na cidade de Fortaleza – CE, foi comprovada a associação deste patógeno com diarreia infantil persistente (FANG *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1992; WANKE *et al.*, 1991). Estudo recente realizado na cidade de Botucatu, Estado de São Paulo, demonstrou a associação de EAEC com diarreia aguda (RODRIGUES *et al.*, 2002). Esses relatos indicam que pode ter ocorrido uma

inversão da frequência de EAEC em relação à EPEC, anteriormente prevalente em crianças menores de 2 anos de idade em nosso meio.

DAEC aderem difusamente à superfície das células HeLa ou HEP-2, derivando desse fato sua designação. O papel das DAEC na diarreia é controvertido, uma vez que alguns estudos epidemiológicos e com voluntários adultos não demonstraram associação desta categoria de bactérias com diarreia aguda, estando presente em indivíduos com e sem diarreia (SCALETSKY, *et al.*, 2002; GOMES, 1989; LEVINE, 1988).

As infecções parasitárias em seres humanos são um importante problema de saúde, sobretudo em países tropicais e/ou em desenvolvimento, onde ocorrem áreas de saneamento inadequado e baixo nível sócio-econômico. Em áreas urbanas, a frequência das crianças em instituições aumenta a chance de infestação (GUERRANT, 1991).

Dentre os protozoários, os mais importantes na etiologia das diarreias são *Giardia lamblia* e a *Entamoeba histolytica*.

G. lamblia é um parasita cosmopolita com larga distribuição em todo mundo. Pode causar surtos epidêmicos, como aconteceu nos Estados Unidos devido à contaminação do sistema de água (BARBOUR, 1976). Estudos realizados no Brasil tiveram dificuldade de estabelecer a importância da *G. lamblia* na etiologia da diarreia devido estes se encontrarem muitas vezes em associação com outros enteropatógenos (ADDAM, 1991)

E. histolytica tem prevalência estimada de 10% a nível mundial, embora isso dependa da população estudada. Pode causar desde um quadro agudo de diarreia até necrose da mucosa, podendo existir portador assintomático (RAVIDIN, 1995).

Os avanços sobre a etiologia, fisiopatologia e o manejo dos casos contribuíram para diminuição da letalidade por diarreia nas diferentes regiões do globo. No entanto, espera-se que a redução da morbidade aconteça a partir da implementação de políticas de saúde que contemplem melhor distribuição de renda, melhoria do saneamento básico, melhor acesso à água e alimentos, dentre outras, visando a melhoria das condições sócio-econômicas da população (CAPRIOLI *et al.*, 1996; HOWIE *et al.*, 1990).

A terapia de Reidratação Oral (TRO) constitui-se em uma prática efetiva, de grande impacto e baixo custo na redução da mortalidade por desidratação causada por diarreia aguda (GRACEY, 1999; SENA, 1999; GALVÃO *et al.*, 1994). Apesar disto, muitas crianças continuam morrendo por falta de acesso a esta simples medida, além de que a mesma isoladamente tem pouco ou nenhum efeito sobre as taxas de morbidade por diarreia. Outras medidas indispensáveis à diminuição da morbimortalidade são: promoção do aleitamento materno, melhorias sanitárias, tratamento adequado da diarreia persistente e vacinações (SANTOSHAN, 1997; GALVÃO *et al.*, 1994).

O papel do leite materno na prevenção da diarreia é inquestionável, pois este é fonte única de determinados fatores que contribuem para a melhor defesa e saúde dos lactentes. A criança alimentada exclusivamente ao seio materno recebe alimento com a melhor qualidade nutricional, assim como 0,5g de imunoglobulina A secretora diariamente, incluindo anticorpos contra *Vibrio cholerae*, *E. coli* enteropatogênica, *Campylobacter*, *Shigella*, *Giardia* e outros patógenos (WATERLOW, 1996; HANSON & BERNDES, 1994) além de promover por ação hormonal, proliferação e recuperação da mucosa intestinal (KODOVSKY & THORNBURG, 1987).

No Brasil, Victora *et al.*, (1989) observaram, em estudo caso-controle, que lactentes que não recebiam leite materno apresentaram chance proporcional 14,2 vezes maior de evolução para o óbito por diarreia do que aqueles alimentados exclusivamente com leite materno. Outros estudos realizados em países em desenvolvimento, como Índia (SACHDEV *et al.*, 1991), Ruanda (LEPAGE, MUNYAKAZI, HENNART, 1981) e Sri Lanka (PERERA *et al.*, 1996), também evidenciaram o importante papel protetor do aleitamento materno contra a morbimortalidade por diarreia em crianças.

Outras estratégias são consideradas imprescindíveis e essenciais, a saber, a melhoria do suprimento de água e das condições sanitárias, promoção da higiene pessoal e doméstica, educação para o desmame e a higiene alimentar. Em 1985, Esrey *et al.*, apresentaram estudo em que resumiram 67 trabalhos realizados em 28 países, assegurando o impacto da melhoria do suprimento de água e das condições sanitárias sobre a morbidade por diarreia.

Em 1996, Esrey *et al.*, analisando dados coletados em oito países, demonstraram que a melhoria das condições sanitárias tinha maior impacto sobre a prevalência da diarreia do que as melhorias no suprimento de água. Estes achados ratificam a importância da promoção da higiene pessoal e doméstica como estratégia preventiva contra diarreia.

Huttly *et al.* (1997) relataram a importância de três tipos de comportamento: 1. a lavagem das mãos – especialmente após a defecação, depois de limpar os bebês e fraldas de crianças, antes de comer e preparar alimentos; 2. o destino das fezes – especialmente de crianças, lactentes e bebês e aqueles com diarreia; 3. a manutenção de água para consumo livre da contaminação fecal.

Vários estudos epidemiológicos sobre fatores de risco relatam uma estreita correlação entre os hábitos higiênicos e a diarreia. Gorter *et al.*, em 1998, na Nicarágua, ressaltaram a atenção para lavagem das mãos, a limpeza no ambiente doméstico e a importância do nível de educação materna para implementação destas práticas. No Brasil, em Pernambuco, Vasquez *et al.*, 1999, estudando 5436 crianças menores de cinco anos, demonstraram que a ausência de condições sanitárias satisfatórias no domicílio é um importante fator de risco para a ocorrência da diarreia, uma vez que proporciona um ambiente adequado para a proliferação de microorganismos enteropatogênicos e a contaminação da população mais susceptível, que é a infantil.

A diarreia suscita interessantes discussões quanto aos seus aspectos epidemiológicos, clínicos e etiológicos. Vários estudos têm evidenciado a importância da variação de enteropatógenos em diferentes regiões, de acordo com a estação do ano, a população estudada (urbana ou rural), as classes sócio-econômicas, a localização geográfica e a idade do hospedeiro (SCALETSKY *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2002 ; ORLANDI *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1991). Devido à ausência de dados precisos sobre a diarreia infantil, em relação a esses aspectos, na cidade de João Pessoa, Estado da Paraíba, Nordeste brasileiro, região onde a prevalência de diarreia é considerada alta (MS, 2001; RIBEIRO, 2000), estimulou a realização do presente estudo. Levando-se em consideração que os maiores índices de prevalência, repercussões desfavoráveis e possibilidades de complicações devido à diarreia, ocorrerem principalmente entre crianças com idade inferior a dois anos, determinaram a realização deste estudo nesta faixa etária onde os

agravos decorrentes da diarreia aguda assumem fundamental importância e requerem uma atenção terapêutica e preventiva especial.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar a frequência de isolamento dos principais agentes etiológicos da diarreia aguda em crianças menores de dois anos de idade com diarreia aguda (casos) bem como naquelas que não apresentavam sintomas gastrointestinais (controles) que procuraram o Serviço ambulatorial do Complexo Pediátrico Arlinda Marques, localizado na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba. Identificar e analisar os fatores de risco e proteção para o desenvolvimento da doença diarreica aguda.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de *E. coli* diarreiogênica, *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *Campylobacter*, *Yersinia Enterocolítica*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica* nos casos e controles.
- Verificar a ocorrência dos diferentes enteropatógenos nos períodos chuvoso e de estiagem.

- Identificar os fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas de grupos diarreico e controle e identificar os sorotipos mais prevalentes.
- Identificar e analisar, através de estudo pareado do tipo caso-controle, a importância de fatores potenciais de risco e de proteção para o desenvolvimento da doença diarreica aguda causada por agente bacteriano.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Localização do estudo

A presente investigação foi desenvolvida na sala de Tratamento de Reidratação Oral (TRO) do ambulatório do Complexo Pediátrico Arlinda Marques, localizado em João Pessoa - PB. Trata-se de um complexo hospitalar pediátrico, de caráter público, que presta assistência médica tanto à população local quanto à oriunda de outros municípios do Estado da Paraíba. Conta com 3 enfermarias, 2 UTIs neonatal e um ambulatório com 22 consultórios, uma sala de enfermagem, nutrição, odontologia, farmácia, sala TRO com 15 leitos, auditório, sala de aplicação de injetáveis, sala de nebulização e pesagem e laboratório de análises clínicas. O Complexo Pediátrico Arlinda Marques realizou, em média, 7.456 atendimentos mensais no ano de 2000, segundo dados fornecidos pelo setor de informática do referido complexo.

A cidade de João Pessoa, capital do estado da Paraíba, localiza-se no litoral do nordeste brasileiro. Sua população é de aproximadamente 700 mil habitantes (IBGE, 2002). Tem clima quente e úmido, do tipo intertropical. A temperatura do ar é predominantemente elevada (média de 26,6° C). Apresenta dois períodos climáticos bem definidos, sendo o período chuvoso correspondente aos meses de abril a setembro e o de estiagem de outubro a março, podendo

sofrer pequenas variações. Sua economia é baseada no turismo, na agropecuária e na extração mineral.

3.2 Desenho do estudo

3.2.1 Estudo caso-controle

Os pacientes foram escolhidos de acordo com a ordem de chegada no ambulatório pediátrico do referido complexo, no período da manhã, entre agosto de 2000 e julho de 2001. Foram coletadas amostras fecais de 290 crianças, pareados 1:1. O primeiro grupo (casos) foi constituído por crianças menores de dois anos com diarreia aguda definida como três ou mais evacuações de fezes não formadas ou aquosas por dia, com duração inferior a 14 dias. O segundo grupo (controles), de crianças sem sintomas compatíveis com o quadro diarreico nos 30 dias anteriores ao atendimento ambulatorial, e admitidos até 07 dias após a entrada do respectivo caso (Tabela 1). Os dois grupos eram provenientes da mesma instituição, que atende ao SUS (Sistema Único de Saúde).

Tabela 1. Distribuição das crianças estudadas nos grupos diarreicos e controle, segundo a faixa etária

Grupos	Faixa etária	Grupo diarreico		Grupo controle	
		Número	%	Número	%
Grupo I	0 a 11 meses a 29 dias	188	65	188	65
Grupo II	12 meses a 23 meses e 29 dias	102	35	102	35
TOTAL		290	100	290	100

3.2.2 Critério de exclusão

Foram excluídos da pesquisa pacientes em uso de antibióticos até 15 dias antes da coleta da amostra fecal em ambos os grupos, crianças maiores de 2 anos de idade e residentes em outros municípios.

3.2.3 Método empregado para coleta de dados

No momento da consulta foram anotados dados clínicos e epidemiológicos, através da anamnese e exame físico dos Pacientes envolvidos nesse estudo.

3.2.4 Variáveis do estudo

Os potenciais fatores de risco relacionados à infecção diarreica que foram avaliados são:

- Sexo do paciente;
- Exposição da criança a diferentes formas de cuidado fora do lar;
- Exposição à água fervida
- Animais domésticos;
- Condições sócio-econômicas;
- Fonte de água utilizada no domicílio;
- Tipo de leite recebido;

As mesmas variáveis analisadas para os casos foram observadas no grupo controle.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética Médica do Complexo Pediátrico Arlinda Marques / João Pessoa. O consentimento esclarecido por

escrito foi obtido dos pais ou responsáveis, após terem recebido informações detalhadas sobre a natureza da investigação (anexo I).

3.3. Dados clínicos e epidemiológicos

A anamnese clínica e os dados epidemiológicos foram obtidos através de entrevista com a mãe ou acompanhante do paciente e armazenados em questionário individual, arquivado na Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (anexos II e III).

O questionário constou da identificação da criança, sexo, procedência, duração da diarreia antes da data do atendimento. Foram anotados outros sinais clínicos como: febre, vômito, desidratação, e presença de sangue nas fezes.

Nas crianças do grupo controle foi anotado o motivo da consulta e a data do início da doença aguda, quando presente.

3.4 Definições

Os seguintes fatores de risco e de proteção que foram estudados são:

3.4.1. Sexo do paciente

3.4.2. Exposição das crianças a diferentes formas de cuidados fora de sua residência.

3.4.2.1. Creche - foi considerada como creche toda instituição credenciada para ministrar cuidados a lactentes e pré-escolares, com fins lucrativos ou mantida por organizações beneficentes ou pelo poder público, onde as crianças só permanecem durante uma parte do dia. Foram incluídos neste item somente os

lactentes que compareceram nas creches nos sete dias anteriores ao início da doença aguda ou do atendimento médico naqueles sadios ou com patologias crônicas.

3.4.2.2 Outra residência - nesta categoria foi incluída outras residências de familiares ou não, com ou sem remuneração envolvida, desde que o lactente fosse exposto ao convívio de outras crianças, nos sete dias que antecederam ao início da doença aguda ou ao atendimento médico.

3.4.2.3. Permanência apenas em casa - foram englobados neste item todos os lactentes que receberam assistência em sua própria casa, quer por familiares, quer por outras pessoas envolvidas nos trabalhos domésticos, nos sete dias que precederam o início da doença aguda ou o atendimento médico.

3.4.2.4. Outras situações - quando o local de permanência das crianças não se enquadrava nos itens acima, visando principalmente agrupar os lactentes institucionalizados.

3.4.3. Número de pessoas que moravam na casa

3.4.4. Aglomeração - para avaliar melhor a influência do número de pessoas que dormiam na casa pelo número de dormitórios.

3.4.5. Exposição a animais - foi pesquisada a presença de animais de qualquer espécie no domicílio dos lactentes, se estes animais permanecem nas dependências interiores da casa e também o seu estado de saúde, investigando em especial a ocorrência da doença diarreica.

3.4.6. Condições sócio-econômicas - foi utilizada como indicador a renda mensal dos familiares e de todos os agregados da família que contribuíam para o orçamento doméstico.

3.4.7. Fonte de água - foi pesquisada a fonte de água utilizada para beber, no domicílio de cada lactente, durante a semana anterior ao início da doença ou da consulta médica, especificando a sua procedência e outras situações.

3.4.8 Tipo de leite - foi averiguado qual o tipo de leite consumido pelos lactentes nas duas semanas que precederam o início da doença aguda ou o atendimento médico. Foi pesquisado se cada tipo de leite foi ingerido de maneira exclusiva, ou se ocorreu ingestão simultânea de outro tipo de leite. Foi considerada ingestão usual aquela cuja frequência de mamadas de outro tipo de leite foi inferior a uma por dia. Em toda a análise somente foi considerada a ingestão de leite, não foi considerado o consumo de outros tipos de alimentos.

3.5 Metodologia

3.5.1. Coleta e Transporte de material

As amostras de fezes foram coletadas durante o atendimento ambulatorial com auxílio de swabs retais, mantidos em meio de transporte Cary-Blair (OXOID®). O material clínico foi enviado ao Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal da Paraíba, para o processamento em meios adequados para a pesquisa de bactérias patogênicas pertencentes à família Enterobacteriaceae (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Yersinia*), e para pesquisa de *Campylobacter sp* termofílico.

No mesmo período foi também colhido em depósito coletor universal, amostra fecal das mesmas crianças para realização do exame parasitológico de

fezes, que foi realizado no Laboratório de Parasitologia do Núcleo de Medicina Tropical, UFPB.

3.5.2. Isolamento de enteropatógenos bacterianos a partir de fezes:

A coprocultura foi realizada segundo metodologia clássica descrita em Martinez (1996). As fezes foram semeadas nos seguintes meios:

Agar MacConkey (OXOID®) – empregado para o isolamento de enterobactérias em geral

Agar SS (OXOID®) – meio seletivo para o crescimento de microorganismos dos gêneros *Shigella* e *Salmonella*.

Meio Skirrow modificado – seletivo para o isolamento de *Campylobacter sp*;

Agar Verde brilhante (OXOID®) – seletivo para o isolamento de *Salmonella*.

Neste último, as fezes foram semeadas após o enriquecimento em caldo tetrationsato, incubadas durante 18 horas, à 37°C.

Todas as placas de isolamento foram mantidas à 37°C durante 24 horas, exceto o meio Skirrow conservado durante 48 horas, à 42°C em condições microaerófilas, antes de serem examinadas.

3.5.3. Identificação

A triagem das colônias bacterianas foi feita isolando-se da placa de ágar MacConkey, 5 colônias fermentadoras de lactose (Lac +) e de 2 a 3 não fermentadoras de lactose (Lac -) isoladas dos meios de MacConkey e que apresentaram-se morfologicamente diferentes.

Da placa SS, foram selecionadas uma colônia lac – (incolor e transparente) de cada tipo; H₂S + (com centro preto) e H₂S – (sem centro preto), e uma lac + (colônia vermelha).

Da placa de VB, foi selecionada uma colônia lac – (rosa-esbranquiçada, circundada por um meio vermelho brilhante), típica de *Salmonella*.

Quando havia colônias puntiformes nos meios de isolamento, que levavam a um suspeita da presença de *Yersinia*, o tempo de incubação foi prolongado por mais 24 horas e só depois foram submetidas à identificação bioquímica.

Para identificação de *Campylobacter sp*, foi observada colônias suspeitas através de exame microscópico. De cada colônia foi feito um esfregaço corado pelo método de Gram e pesquisada à microscopia óptica comum, a morfologia característica – bacilos Gram-negativos delgados, com a forma de “S” ou “asa de gaivota”. Seguida da utilização das reações de catalase e oxidade para confirmação do gênero.

3.5.4. Identificação bioquímica de colônias bacterianas suspeitas de enteropatogênicas:

Foram utilizados os meios EPM, MILI e citrato para identificação de enterobactérias a partir das técnicas descritas por Ewing (1986).

3.5.5. Identificação sorológica de colônias bacterianas suspeitas de enteropatogênicas:

Para a identificação de *E. coli* foram utilizados como triagem, anti-soros “OK” específicos, polivalentes e monovalentes (PROBAC do Brasil), para a detecção dos sorogrupos de *E. coli*: EPEC, EIEC e 0157:H7.

Amostras identificadas bioquimicamente como *Shigella* foram submetidas à aglutinação em lâmina com anti-soros polivalentes específicos para *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* (PROBAC do Brasil®).

Colônias identificadas bioquimicamente como *Salmonella* foram testadas por aglutinação em lâmina com anti-soro polivalente somático com antisoros da Probac do Brasil.

Todas as cepas identificadas como *Salmonella* e *Shigella*, foram encaminhadas para o Instituto Adolfo Lutz para serem sorotipadas.

Após estes procedimentos, as colônias selecionadas foram codificadas, registradas e enviadas ao laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em São Paulo, uma vez ao mês, em média, a fim de se realizar as etapas descritas a seguir.

3.5.6. Pesquisa de seqüências gênicas relacionadas aos fatores de virulência de *E. coli*

Foram pesquisados vários marcadores de virulência em amostras de *E. coli* isoladas de casos diarreicos e controle. Os fatores de virulência que foram pesquisados incluíram: toxinas (LTi, STh, STp). As enterobactérias foram

identificadas a partir das técnicas descritas por Ewing (1986), Toxina de Shiga (STx1 e STx2), fator de adesão localizada (EAF), invasão (INV), *Bundle Forming Pili* (*bfpA*), intimina (*eae*) e fator enteroagregativo (EAEC).

Para avaliação dos marcadores de virulência das amostras de *E. coli*, utilizamos sondas genéticas, que são capazes de evidenciar seqüências de virulência relacionadas com a capacidade de aderência, invasão e produção de toxinas (CARVALHO, 2000). As sondas genéticas são segmentos específicos de ácidos nucléicos que podem ser usados na pesquisa de seqüências homólogas de genomas de bactérias ou algum tipo de célula eucariótica (SILVA & GOMES, 1994).

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia (Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina) da Profa. Dra.Tânia A. T. Gomes, através da técnica de hibridação de DNA de colônias bacterianas (MASS, 1983). As sondas utilizadas estão descritas na tabela 2.

3.5.6.1. Preparo dos Filtros

As amostras bacterianas foram semeadas em placas de ágar MacConkey (Oxoid®) através da técnica de semeadura de placas-mestre e incubadas a 37°C por 18 h. Em cada placa foi semeada no máximo 50 amostras, incluindo-se a *E. coli* contendo plasmídio pBR322 (controle negativo de hibridização), a amostra de *E. coli* K12 contendo a sonda (controle positivo I) e uma amostra selvagem que expressa a característica relacionada à sonda (controle positivo II). Utilizamos uma amostra selvagem como controle positivo, pois a positividade das amostras-teste

pode não ser tão forte quanto o sinal obtido na hibridação da sonda-sonda. Logo, foi considerado positivo quando equiparável com a amostra selvagem.

Após a incubação, um filtro de Papel Whatman 541 de 9 cm de diâmetro (Whatman, New Jersey, EUA) foi colocado sobre a superfície de cada placa e pressionando sobre as colônias, para possibilitar a transferência das mesmas para o filtro. A placa com o filtro foi incubada a 37°C por 1 h. em seguida, os filtros foram tratados conforme procedimento descrito por Mass, 1983, transferindo-os para um recipiente contendo solução desnaturante (anexo IV), seguido da exposição aos vapores da água em ebulição por 3 minutos. Os filtros foram transferidos para um outro recipiente contendo solução desnaturante e mantidos por 1 minuto à temperatura ambiente. Em seguida os filtros foram colocados em um recipiente contendo solução neutralizante (anexo IV) e mantidos por 4 minutos à temperatura ambiente. A fixação do DNA aos filtros foi realizada pelo calor (65°C/30 minutos). Os filtros assim preparados foram guardados à temperatura ambiente até o momento do uso.

3.5.6.2. Marcação radioativa das sondas

Os fragmentos de DNA empregados como sondas foram marcadas com [α -³²P]dATP (Amershan Life Science Products, Illinois, EUA) pelo método de *nick translation* (RIGBY et al, 1977).

3.5.6.3. Reação de hibridização de DNA

Os filtros foram pré-hibridizados com uma solução de hibridização na proporção de 5 ml por filtro e incubados a 37°C, sob agitação suave, durante 1 h. em seguida, os filtros foram imersos em nova solução de hibridização contendo

DNA carreador a 100 µg/ml e, aproximadamente, 10 cpm/ml da sonda marcada e desnaturada a 100°C por 5 minutos, seguindo-se de incubação a 37°C por 18 h, sob agitação suave. Após esse período, os filtros foram lavados três vezes com uma solução de salina-citrato 2x a 37°C por 30 minutos, sob agitação suave. Os filtros foram secos a 37°C e foram dispostos em cassetes apropriados com tela intensificadora para serem autoradiografados através de exposição a filmes de raios X (X-Omat-R, Eastman Kodak, Rochester, EUA), durante um período de 24-72 h a - 70°C. a revelação foi realizada de acordo com as especificações do fabricante.

Tabela 2. Marcadores de virulência pesquisados na caracterização das categorias de *E.coli* diarreio gênicas.

Categoria de <i>E. coli</i> diarreio gênica	Marcadores de virulência
<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	<i>eae</i> ^a , <i>EAF</i> ^b , <i>bfpA</i> ^c
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	LT-I ^d , ST-I _p ^e , ST-I _h ^f
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora (EIEC)	Plasmídio <i>Inv</i> ^g
<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC)	Stx 1 ^h , Stx2 ⁱ
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	EAEC ^j

^a, intimina de EPEC (JERSE et al., 1990)

^b, plasmídio *enteropathogenic adherence factor* (NATARO et al., 1985)

^c, fimbria *bundle-forming pilus* (GIRON et al., 1993)

^d, enterotoxina termolábil I (MOSELEY et al., 1980)

^e, toxina termoestável I (MOSELEY et al., 1980)

^f, toxina termoestável I de humanos (MOSELEY et al., 1982)

^g, plasmídio relacionado ao fenótipo de invasão (SMALL; FALKOW, 1986)

^h, toxina de Shiga 1 (NEWLAND et al., 1988)

ⁱ, toxina de Shiga 2 (NEWLAND et al., 1988)

^j, região conservada do plasmídio EAEC (BAUDRY et al., 1990)

Após esse procedimento, foi realizada a identificação sorológica do antígeno O, em todas as cepas que apresentaram positividade a algum marcador de virulência.

3.5.7. Identificação do sorotipo de cepas bacterianas identificadas como *E. coli*, pertencentes aos sorogrupos de EPEC, ETEC, EAEC e EIEC:

Todas as amostras identificadas como *E. coli* diarreiogênica foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para sorotipagem dos antígenos O e H, segundo técnica clássica descrita por Ewing (1986).

3.5.8. Pesquisa de invasividade

A pesquisa de invasividade foi realizada nas cepas de *E. coli* dos sorogrupos invasores através do teste de Serény. Este teste consiste na aplicação em saco conjuntival de cobaias albinos, de um inoculo bacteriano 10^8 células. O teste foi considerado positivo, quando houve o aparecimento de cerato-conjuntivite dentro de um período de sete dias após a inoculação, sendo os cobaias examinados diariamente (SERENY, 1963).

3.5.9 Teste de adesão bacteriana às células HEp-2:

O ensaio de adesão às células HEp-2 ou HeLa é o elemento de maior importância na diferenciação das categorias de *E. coli* enteroaderentes, EPEC, EAEC e DAEC, e constitui-se o teste de referência para detecção destas categorias.

Este teste foi realizado na presença de D-manose, segundo a técnica descrita por CRAVIOTO *et al.*, em 1979.

Para realização do teste de adesão, foram selecionadas todas as cepas de *E. coli* que apresentaram sorogrupos de EPEC utilizando soros poli e monovalentes da PROBAC e aquelas que tiveram os seguintes marcadores de virulência (EAEC, *eae*, *bfpA* e EAF) além dessas, foram selecionadas 118 amostras controles que não apresentaram positividade a nenhum marcador de virulência.

3.5.9.1. Cultivo das células HEp-2:

As células HEp-2 foram cultivadas a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂, em garrafas estéreis de poliestireno apropriadas para o cultivo (Nunc Inc Dinamarca) contendo Meio de Eagle modificado (MEM Sigma-Aldrich Química Brasil Ltda) acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10% e antibiótico (penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL), denominado MEM completo.

Para a realização do repique para microplacas de poliestireno de 24 câmaras o meio de cultivo (MEM completo) foi desprezado e a monocamada celular foi descolada da garrafa utilizando-se *cell scrapers* e recuperadas com 5 ml de meio de cultura.

Utilizou-se uma alíquota de 1,5 ml de suspensão contendo cerca de $1,0 \times 10^5$ células por ml em cada câmara, contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro. As placas foram incubadas em estufa a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por 48 h para obtenção de uma monocamada celular sub-confluente.

3.5.9.2. Preparo das amostras bacterianas:

As amostras bacterianas foram semeadas em 3 ml de TSB e incubadas a 37°C, por 16 a 18 horas, a partir do estoque em ágar nutriente.

3.5.9.3. Realização do teste de adesão às células HEp-2:

O meio de cultivo MEM – SFB 10% (v/v) foi retirado dos orifícios de cultura contendo a monocamada incompleta de células HEp-2, realizando-se, a seguir, três lavagens com solução tampão salina – fosfato de Dulbecco – Vogt, pH 7,4 (PBS – D – V) (anexo V) (DULBECCO & VOGT, 1954).

Em seguida, foram acrescentados: 0,96 ml de novo meio MEM, contendo 2% de soro fetal bovino (MEM – SFB 2%) e 1% (v/v) de D-manose (anexo V), para inibir a adesão bacteriana devido à fimbria tipo I, e 40µl de crescimento bacteriano em TSB.

Esse sistema foi incubado durante 3 horas em estufa a 37°C e, posteriormente, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada por cinco vezes com PBS, a fim de se retirar as bactérias que não se aderiram às células em cultivo.

Em seguida, as preparações foram fixadas com metanol durante 30 minutos, procedendo-se, posteriormente, à coloração com May – Grünwald (anexo V) na diluição 1:2 (v/v) com solução tampão Sørensen M/15 (anexo V), durante 5

minutos. O corante May – Grünwald foi desprezado e, a seguir, adicionado o corante Giemsa (anexo V) na diluição 1:3 (v/v) com o mesmo tampão, durante 20 minutos.

Após este período, as preparações foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente ou a 37° C e observadas ao microscópio óptico, com os aumentos de 400 e 1000 vezes.

Reservou-se uma lamínula de células HEp-2, sem bactérias, como controle das células HEp-2.

As amostras bacterianas que não apresentaram um padrão de adesão claramente definido após 3 horas de incubação foram submetidas a novo teste, estendendo-se o período de incubação para 6 horas. Desta feita, posterior à incubação inicial de 3 horas a 37° C, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por um período adicional de 3 horas, após ter sido adicionado novo meio MEM – SFB 2% (v/v).

Para a leitura dos resultados, os seguintes padrões de adesão foram considerados:

- Adesão localizada (AL)= identificada pela formação de microcolônias de bactérias tipicamente aderidas a sítios localizados da célula;
- Adesão difusa (AD) = quando as bactérias se aderem ao acaso por toda a superfície celular;
- Adesão agregativa (AA) = caracterizada pela adesão das bactérias sobre as células e nos espaços intercelulares, com a disposição típica de tijolos empilhados (stacked bricks);

- Adesão localizada – like (ALL) = as bactérias aderidas aparecem em microcolônias muito pequenas em menos de 1% das células, com apenas 3 horas de incubação, e, quando este período é prolongado para 6 horas, as microcolônias aparecem em agrupamentos mais frouxos, aderidos a menos de 10% das células.

No presente estudo, utilizou-se o teste de adesão às células HEp-2 para a identificação das *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC = adesão localizada), enteroagregativa (EAEC = adesão agregativa), DAEC (*E. coli* com adesão difusa) e *E. coli* ALL (adesão localizada-like) (NATARO & KAPER, 1998; SCALETSKY *et al.*, 1999).

3.5.10. Pesquisa de parasitas intestinais:

A amostra fecal destinada ao estudo parasitológico foi submetida aos seguintes procedimentos no Laboratório de Parasitologia do NUMETROP: exame direto a fresco e método de Hoffman Pons & Janer. As duas técnicas parasitológicas acima referidas estão descritas em Pessoa & Martins (1988) e Amato-Neto & Corrêa (1990).

3.5.11 Análise estatística:

O procedimento estatístico utilizado neste trabalho foi dividido em duas partes:

3.5.11.1. Análise da prevalência de enteropatógenos no grupo diarreico e controle - para se estimar a associação entre a exposição aos agentes etiológicos encontrados e a doença diarreica aguda (TAB 6).

Nesta análise foi avaliada a razão de prevalência (R.P.) dos enteropatógenos entre as crianças com diarreia (casos) e aquelas sem sintomas gastrintestinais (controles). Ela reflete quantas vezes a prevalência dos microorganismos enteropatogênicos foi maior nos casos em relação aos controles.

3.5.11.2. Análise dos fatores potenciais de risco e de proteção - O pareamento por grupos etários foi sempre mantido.

O risco relativo (R.R.), ou seja, o risco de doença nos indivíduos expostos a determinado fator de risco, relativo ao risco de doença naqueles não expostos, representa quanta vezes mais (ou menos) a doença ocorrerá no grupo exposto quando comparado ao não exposto. O Odds Ratio é empregado nos estudos caso-controle, como medida aproximada de risco relativo (BRESLOW, 1999).

Nos estudos pareados, do tipo caso-controle, com um controle para cada caso, o odds ratio é dado pela razão entre os pares caso-controle discordantes em relação à exposição ao fator de risco (Anexo 6).

Odds ratio igual à unidade expressa ausência de associação entre o fator analisado e a doença.

Odds ratio > 1 , existe associação positiva entre o fator e a doença, e neste estudo será denominado fator de risco.

Odds ratio < 1 , há associação negativa entre o fator e a doença, ou seja, o fator protege contra o aparecimento da doença e, será chamado fator de proteção.

Para verificar a significância estatística das associações foi utilizado o teste de hipóteses pelo método de qui-quadrado e calculado o intervalo de confiança 95% do odds ratio através do Teste de Mantel-Haenzel adaptado através do software EPI-INFO 2000 do CDC. Em todos os testes foi adotado o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Foram excluídos do estudo todos os casos onde foi encontrado associação mista. A exposição a protozoários não foi analisada.

4. RESULTADOS

Durante o período em que se desenvolveu o estudo foram colhidas amostras de fezes e aplicado o questionário epidemiológico a um grupo de 290 crianças com diarreia e 290 controles, pareados conforme idade (Tabela 1 - Casuística e métodos).

As crianças do grupo controle, todas sem diarreia nos últimos 30 dias que antecederam ao início da doença aguda ou do atendimento médico, apresentavam as mais diversas patologias, com predomínio dos distúrbios respiratórios e doenças dermatológicas.

4.1. Frequência de isolamento de enteropatógenos nos grupos diarreico e controle.

Em 78,2% dos casos foram identificados enteropatógenos, nos quais 68,6% apresentava apenas um patógeno, enquanto que em 9,6% foram isolados múltiplos patógenos e em 21,8% não foi encontrado nenhum patógeno. Nos controles, somente 12,1% apresentou um enteropatógeno e em apenas um caso foram isolados múltiplos patógenos (0,3%). (Figura 1)

Figura 1 Porcentagem dos 290 casos e 290 controles , com patógeno único, múltiplos patógenos e sem patógenos.

4.2. Pesquisa dos marcadores de virulência

Foram pesquisados marcadores de virulência em 2.344 amostras de *E. coli* isoladas de casos diarreicos e controle. O mais freqüentemente encontrado foi o fator agregativo, num total de 128 amostras casos e 38 controles. Em nenhuma amostra foi encontrada Stx de EHEC (Tabela 3).

Tabela 3. Ocorrência de marcadores de virulência pesquisados por sondas em 1238 cepas de *E. coli* isoladas de casos diarreicos e de 1106 cepas isoladas de grupos controle.

Sonda Genética	Propriedade Pesquisada	Casos (n= 1238 cepas)	Controles (n=1106 cepas)
EAEC	Região conservada no plasmídio EAEC	128	38
bfpA	Fímbria BPF de EPEC	20	0
eae	Attaching-effacing de EPEC	40	2
EAf	Adesão localizada de EPEC	11	0
INV	Invasão de EIEC	9	0
LT-1	Enterotoxina LT-1 de ETEC	46	4
ST-1(h)	Enterotoxina ST-1 de ETEC (suína)	44	6
ST-1(p)	Enterotoxina ST-1 de ETEC (humana)	8	6
Stx 1	Citotoxina Stx 1 de EHEC	0	0
Stx 2	Citotoxina Stx 2 de EHEC	0	0

4.3 Teste de adesão em células HEp-2

Os resultados encontrados nos testes de adesão se encontram descritos nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Padrão de aderência em 111 cepas do grupo diarreico.

Padrão de adesão	Nº de amostras positivas	Adesão de 3 h	Adesão de 6 h
Localizada	5	5	
Localizada-like	27	-	27
Agregativa*	42	42	-
Agregativa**	32	18	14

*amostras positivas para sonda EAEC

**amostras sem nenhum marcador de virulência

Tabela 5. Padrão de aderência em 118 cepas do grupo controle

Padrão de adesão	Nº de amostras positivas	Adesão de 3 h	Adesão de 6 h
Localizada-like	2	-	2
Agregativa*	16	9	7
Agregativa**	9	-	9

*amostras positivas para sonda EAEC

**amostras sem nenhum marcador de virulência

4.4. Isolamento de enteropatógenos nos grupo diarreico e controle

E. coli enteroagregativa foi o patógeno mais predominante, presente em 74 (25,5%) casos e em 24 (8,3%) controles, com frequência 3 vezes maior nos casos (Tabela 6)

Todos os enteropatógenos foram isolados com frequência superior nos casos em relação aos controles.

Embora pesquisados, *Yersinia enterocolítica* e *E. coli* produtora de toxina Shiga, não foram isolados em nenhum dos 580 casos estudados.

Tabela 6. Frequência de enteropatógenos em fezes de crianças com e sem diarreia aguda na cidade de João Pessoa - PB

PATÓGENO	Nº(%) de crianças infectadas		R.P.	p
	Grupo diarreico	Grupo Controle		
EAEC ¹	74 (25,5)	24 (8,3)	3,0	<0,01
Sonda EAEC+	42 (14,5)	16 (5,5)	2,6	<0,01
Sonda EAEC - ²	32 (11,0)	08 (2,7)	04	<0,01
EPEC	32 (11,0)	01 (0,3)	32	<0,01
Típica ³	05 (1,7)	0	5/0	-
Atípica ⁴	27 (9,3)	01 (0,3)	27	<0,01
ETEC	29 (10,0)	08 (2,8)	3,6	<0,01
EIEC	05 (1,7)	0	5/0	-
<i>Salmonella sp</i>	23 (7,9)	0	23/0	-
<i>S. Saintpaul</i>	13 (4,5)	0	13/0	-
<i>S. Typhimurium</i>	08 (2,8)	0	8/0	-
<i>S. Enteritidis</i>	01 (0,3)	0	1/0	-
<i>S. entérica sub. entérica</i> 4,5,12eh:-	01 (0,3)	0	1/0	-
<i>Shigella sp</i>	12 (4,1)	0	12/0	-
<i>S. flexneri</i> 5	06 (2,0)	0	6/0	-
<i>S. flexneri</i> 1	02 (0,7)	0	2/0	-
<i>S. sonnei</i>	04 (1,4)	0	4/0	-
<i>Campylobacter sp</i>	07 (2,4)	0	7/0	-
<i>Giardia lamblia</i>	27 (9,3)	03 (1,0)	9	<0,01
<i>Entamoeba histolytica</i>	17 (5,8)	0	17/0	-
Total	227 (78,2)	36 (12,4)	6,3	<0,01

¹= cepas de *E. coli* enteroagregativa identificadas por Padrão de adesão agregativo e/ou Sonda EAEC+ ; ²= cepas de *E. coli* enteroagregativa com Sonda EAEC -, porém com padrão de adesão agregativo; ³= Cepas de *E. coli* enteropatogênica clássica típica (EAF+ e/ou padrão de adesão localizado em 3 h de ensaio); ⁴= cepas de *E. coli* enteropatogênica clássica atípica (eae+ e/ou eae+ e bfp+ com padrão de adesão localizado-like em 6 h de ensaio).

4.5. Isolamento de enteropatógenos segundo grupos etários

Quando a casuística foi dividida conforme grupos etários (Tabela 1), observou-se que entre casos a porcentagem de lactentes com patógenos nas

fezes foi maior no grupo 2, embora a casuística tenha sido maior no grupo 1. Houve predomínio de determinados patógenos em cada grupo (Figura 2)

Figura 2. Porcentagem de enteropatógenos Isolados de crianças com diarreia e sem diarreia, segundo faixa etária

EPEC = *E. coli* enteropatogênica clássica; EAEC = *E. coli* enteroagregativa; ETEC = *E. coli* enterotoxigênica; EIEC = *E. coli* enteroinvasora; SHIG = *Shigella* sp; SALM = *Salmonella* sp; CAMPY = *Campylobacter* sp; PARAS = Parasitas; NP = nenhum patógeno.

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$)

4.6. Isolamento de enteropatógenos segundo estações climáticas

Protozoários ocorreram durante todo o ano, porém com predomínio no período de estiagem. EAEC, EPEC e ETEC foram mais freqüentes no período de estiagem em comparação com o chuvoso. O contrário ocorreu com EIEC, *Shigella*, *Salmonella* e *Campylobacter*, que foram mais freqüentes no período chuvoso (Figura 3). Apenas *Campylobacter* sp apresentou sazonalidade estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Figura 3. Porcentagem de enteropatógenos isolados dos 580 pacientes estudados, segundo estação climática (período chuvoso e período de estiagem)

* diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$)

Período chuvoso: abril-setembro – N= 105

Período de estiagem: outubro-março – N= 185

4.7. Infecções Mistas

Algumas das crianças com diarreia exibiam mais de um patógeno nas fezes. Em 32 (11,0%) dos 290 casos diarreicos, foram recuperados mais de um patógeno nas fezes. Sendo que 59,4% deste total pertenciam ao grupo etário de menores de 1 ano.

A associação mais freqüente foi entre EAEC + *Salmonella*, ocorrendo em 6 casos, seguida por EPEC atípica + EAEC que ocorreu em 5 casos. A maioria das crianças com infecções mistas, apresentava dois patógenos nas fezes, e somente três delas, apresentaram três patógenos (Tabela 7).

Tabela 7. Infecções mistas em 290 crianças com diarreia aguda, segundo grupo etário.

ENTEROPATOGENOS	GRUPO I	GRUPO II	TOTAL
EPEC atípica + ETEC	03	00	03
EPEC atípica + EAEC	04	01	05
EPEC atípica + Salmonella	01	00	01
EPEC atípica + Parasitas	00	02	02
EPEC atípica + Shigella	01	00	01
ETEC + Salmonella	01	00	01
ETEC + EAEC	02	01	03
EAEC + Salmonella	03	03	06
EAEC + EIEC	01	00	01
EIEC + Salmonella	01	00	01
Campy + Parasitas	00	01	01
Salm. + Parasitas	00	02	02
EPEC atípica + EAEC + ETEC	01	00	01
EPEC atípica + EAEC + EIEC	00	01	01
EAEC +ETEC+ Shigella	01	00	01
Shigella + Parasitas	00	01	01
Shigella + Campy	01	00	01
Total	19(59,4%)	13(40,6%)	32(11,0%)

4.8 Quadro clínico

Na tabela 8 encontram-se listados os principais sinais e sintomas apresentados pelo grupo diarreico, segundo agente etiológico. Foram excluídos todos os casos onde foi isolado mais de um agente bacteriano.

Além da diarreia, as principais manifestações encontradas foram presença de muco nas fezes (66,3%), vômitos (53%) e febre (53%). A presença de sangue nas fezes foi observado em 13,0% dos casos diarreicos.

Tabela 8. Sinais e sintomas apresentados pelas crianças com diarreia

Patógenos	Total	Febre	Vômito	Sangue	Muco
EAEC	56	17 (30)	18 (32)	00 (00)	42 (75)
EPEC	12	08 (66)	10 (83)	00 (00)	08 (66)
ETEC	20	15 (75)	18 (90)	01 (05)	12 (60)
EIEC	03	03 (100)	00 (00)	03 (100)	00 (00)
<i>Shigella</i>	08	08 (100)	08 (100)	06 (75)	06 (75)
<i>Salmonella</i>	12	10 (83)	07 (55)	02 (16)	07 (58)
<i>Campylobacter</i>	05	01 (20)	01 (20)	03 (03)	02 (40)
TOTAL	116	62 (53,0)	62 (53,0)	15 (13,0)	77 (66,3)

(%)

4.9. Resultado da sorotipagem dos antígenos somático (O) e flagelar (H) de cepas de *E. coli* diarreiogênicas

As cepas identificadas como EPEC típica, pertenciam aos seguintes sorotipos: O55:H-; ONT:H-; ONT:H2, ONT:H18 e O111:H2.

As 5 cepas identificadas como EIEC pertencem aos seguintes sorotipos: O152H- (2 amostras) e O29:H- (3 amostras). As cinco amostras foram consideradas positivas para o Teste de Serény.

Nas tabelas 9, 10 e 11 encontram-se resumidos os resultados da sorotipagem das amostras identificadas como EPEC atípicas, EAEC, ETEC.

Tabela 9. Identificação do antígeno O e H em cepas identificadas como EPEC atípica.

Sorogrupos	Nº Amostras	Sorotipos encontrados
O3	2	H2
O4	2	H1, H40
O29	1	H40
O49	1	H10
O54	1	H2
O55	2	H-, H7
O86	2	H18
O114	1	H32
O119	6	H2
O125	1	H21
ONT*	6	H-H2,H10,H21,H26,H40

* NT = não tipável

Tabela 10. Identificação do antígeno somático e flagelar em cepas identificadas como EAEC.

Sorogrupos	Nº Amostras	Sorotipos encontrados
O1	4	H1
O3	8	H2
O4	1	H-
O15	1	H18
O16	2	H6
O17	1	H18
O39	5	H49
O65	1	H-
O73	1	H18
O75	1	HNT
O78	2	H10, H-
O86	2	H18
O91	4	H-
O92	2	H3, H33
O99	4	H4, H17
O103	1	H7
O104	2	H4
O119	1	H2
O126	2	H2
O128	1	H35
O129	1	H7
O135	1	H-
O153	2	H-, H2
O176	1	H33
OR*	2	HNT, H2
ONT**	12	H-,H2,H7,H9,H10,H11,H18,H25,H27,H28,H31,HNT

*OR= rugoso ** NT = não tipável

Tabela 11. Identificação do antígeno somático e flagelar em cepas identificadas como ETEC.

Sorogrupos	Nº Amostras	Sorotipos encontrados
O6	8	H16
O15	1	H40
O16	1	H-
O19	1	H-
O21	1	H-
O25	1	H-
O27	1	H7
O34	1	H12
O38	1	HNT
O86	1	HNT
O88	2	H-, H25
O92	1	H19
O104	1	H-
O111	1	H45
ONT*	12	H-, H7, H19, H25, H46
OR**	2	H-

* ONT= Não tipável; **OR= rugoso

4.10. Análise dos Fatores de Risco e de Proteção

Na análise de todos os fatores de risco e de proteção, para o desenvolvimento de diarreia aguda, foram excluídos todos os pares, de cujo controle foi isolado um patógeno nas fezes.

Primeiramente, foi analisada a diarreia aguda causada por qualquer agente etiológico bacteriano e em seguida aquela causada somente por *E. coli* enteroagregativa, onde só foram considerados os pares cujo caso só exibia este patógeno nas fezes. Foram excluídos aqueles com associação de microrganismos.

Sexo

A frequência de crianças do sexo masculino foi maior no grupo diarreico do que no grupo controle, quando analisada a presença de diarreia causada por

todos os agentes etiológicos bacterianos e a causada somente por EAEC. Porém, essa diferença não atingiu níveis significantes (Tabela 12).

Tabela 12. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Sexo masculino

Sexo masculino	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
Todos*	80	12	1,07	0,48– 2,40	0,86
EAEC	38	21	1,5	0,58 – 3,9	0,35

*todos os agentes bacterianos

Cuidados fora do lar

O comparecimento a creches, na semana anterior ao início da doença ou do atendimento médico, revelou-se um fator de risco estatisticamente significante, enquanto que a permanência em casa, foi um fator protetor (Tabelas 13,14,15) tanto para diarreia causada por todos os agentes bacterianos e aquela causada somente por EAEC.

Tabela 13. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição a creches

Creche	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	85	10	2,2	0,94 - 5,17	0,04
EAEC	18	2	5,2	1,0 – 3,8	0,024

*todos os agentes bacterianos

Tabela 14. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição a outras residências

Outra residência	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	<i>p</i>
todos*	47	4	4,7	1,4 – 17,7	0,003
EAEC	9	2	2,1	0,3 – 15,4	0,36

*todos os agentes bacterianos

Tabela 15. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Permanência em casa

Só em casa	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	<i>p</i>
todos*	54	22	0,2	0,06 – 0,7	0,003
EAEC	29	20	0,2	0,05 – 0,8	0,0007

*todos os agentes bacterianos

Número de pessoas na casa e em cada dormitório

Nesta análise as crianças foram divididas em dois grupos: aqueles que residiam com mais de três pessoas em seu domicílio, ou em cada dormitório, e aqueles que estavam expostos a até três pessoas por residência ou no dormitório (Tabelas 16,17,18, 19).

A frequência de crianças que residiam com mais de três pessoas foi maior nos casos do que nos controles. Esta diferença foi estatisticamente significativa e, portanto se configurou como um fator de risco para aquisição de diarreia aguda por EAEC e naquela de etiologia bacteriana diversa.

Tabela 16. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Número de pessoas na casa

Nº pessoas na casa (>3)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	120	14	2,2	1,01 – 4,8	0,03
EAEC	49	13	5,9	1,7 – 21,5	0,001

*todos os agentes bacterianos

Tabela 17. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Número de pessoas na casa

Nº pessoas na casa (até 3)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	86	22	0,4	0,21 – 0,99	0,03
EAEC	7	11	0,17	0,05 - 0,59	0,001

*todos os agentes bacterianos

Tabela 18. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Número de pessoas no dormitório

Nº pessoas no dormitório (>3)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	106	9	4,2	1,04 – 16,6	0,01
EAEC	46	9	6,8	1,0 - 48,5	0,01

*todos os agentes bacterianos

Tabela 19. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Número de pessoas no dormitório

Nº pessoas no dormitório (até 3)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	14	5	0,24	0,06 – 0,96	0,01
EAEC	3	4	0,15	0,02 - 0,97	0,01

*todos os agentes bacterianos

Renda Familiar

A renda familiar, incluindo a contribuição para as despesas de todas as pessoas residentes no domicílio, foi significativamente menor nos casos do que nos controles. A frequência de crianças com diarreia por EAEC e aquela de

etiologia bacteriana diversa, provenientes de famílias com rendimento mensais menores do que dois salários mínimos foi maior nos casos do que nos controles (Tabela 20), o que se configurou como um fator de risco nos dois casos.

Tabela 20. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Renda mensal

Renda Mensal (< 2 salários mínimos)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	130	15	3,3	1,47 – 7,2	0,001
EAEC	45	10	5,7	1,7 – 18,8	0,0006

*todos os agentes bacterianos

Exposição a animais domésticos

A presença de animais na residência dos pacientes foi observada em maiores proporções nos casos do que nos controles. Observamos diferenças significantes na frequência de exposição entre casos e os controles, na diarreia aguda causada por EAEC, e naquela causada por qualquer agente bacteriano em níveis estatisticamente significantes (Tabela 21).

Tabela 21. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição a animais domésticos

Animal doméstico	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	136	13	4,8	2,14 – 10,96	0,00001
EAEC	38	10	2,9	0,99 – 8,9	0,029

*todos os agentes bacterianos

Fonte de água

A grande maioria dos domicílios era servida pela rede pública de abastecimento de água (92%). Analisamos a influência do hábito de ferver a água antes da ingestão pela criança. Foram comparadas aquelas que sempre bebiam água fervida com aquelas que nunca o faziam.

Pudemos verificar que a água pode ter sido um veículo de transmissão de enteropatógenos, pois a prática de fervê-la mostrou-se um fator de proteção para o desenvolvimento da diarreia aguda causada por EAEC e por diversos agentes bacterianos (Tabela 22).

Tabela 22. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição à água fervida

Água fervida	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	63	22	0,3	0,15 – 0,72	0,002
EAEC	9	16	0,1	0,03 – 0,33	0,000008

*todos os agentes bacterianos

Tipo de leite ingerido

Analisamos os pacientes que recebiam leite materno de modo exclusivo ou usual e aqueles que não foram alimentados com leite materno ou o foram esporadicamente, nas duas semanas que antecederam ao início da doença ou ao atendimento médico. Bem como, aqueles que se alimentaram de leite de cabra e de leite em pó, de forma exclusiva.

A proteção conferida pelo leite materno foi verificada para diarreia aguda causada por EAEC e para aquela causada por qualquer agente bacteriano (Tabela

23, 24) enquanto que o leite de cabra só se configurou como fator protetor quando as crianças foram expostas a qualquer agente bacteriano (Tabela 25). Porém, quando se estudou a exposição ao leite em pó de forma exclusiva, se observou que este se configurou como fator de risco na aquisição da diarreia aguda tanto àquela causada por EAEC quanto àquela causada por qualquer agente bacteriano. (TAB . 26)

Tabela 23. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição ao leite materno.

Leite materno (> 1 ano)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	5	5	0,2	0,04 – 0,88	0,009
EAEC	2	4	0,1	0,01 – 0,8	0,006

*todos os agentes bacterianos

Tabela 24. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição ao leite materno

Leite materno (< 1 ano)	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	12	10	0,03	0,00 – 0,19	0,0000001
EAEC	7	10	0,1	0,02 – 1,38	0,05

*todos os agentes bacterianos

Tabela 25. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição ao leite de cabra.

Leite de cabra	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	p
todos*	45	8	0,23	0,06 – 0,84	0,009
EAEC	8	4	0,26	0,26 – 1,92	0,12

*todos os agentes bacterianos

Tabela 26. Análise dos fatores de risco e proteção para doença diarreica aguda. Exposição ao leite em pó.

Leite em pó	Nº expostos casos	Nº expostos controles	Odds Ratio	IC 95%	<i>p</i>
todos*	121	5	4,3	1,19 - 16,12	0,009
EAEC	39	2	9,75	1,2 - 95,7	0,006

*todos os agentes bacterianos

5. DISCUSSÃO

A diarreia aguda representa importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, onde é causa importante de morbidade e mortalidade infantil, despertando assim interessantes discussões quanto aos seus aspectos epidemiológicos, clínicos e etiológicos em diferentes regiões do mundo (SCALETSKY *et al*, 2002, MATHAN, 1998, MOLBAK *et al*, 1997, SODEMANN *et al*, 1996; CAPRIOLI *et al*, 1996, TOMKINS, 1991; MAFFEI *et al*, 1990; FAGUNDES-NETO *et al*, 1989).

A alta prevalência de diarreia aguda no nordeste do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002), a falta de dados precisos e de uma investigação abrangente em relação aos aspectos epidemiológicos, estimularam a realização deste trabalho na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba.

A realização deste estudo em crianças com idade até dois anos incompletos se deu devido a freqüente ocorrência de diarreia aguda nesta faixa etária, onde os agravos daí decorrentes, assumem fundamental importância (GRACEY, 1996; SNYDER & MERSON, 1982).

Quanto ao isolamento de enteropatógenos nas 290 amostras fecais de ambos os grupos (casos e controles), observou-se que foi identificado qualquer enteropatógeno em 78,2% das crianças com diarreia aguda e em 12,4% dos

controles, com diferença significativa entre os mesmos ($p < 0,01$), uma prevalência de 6,3 vezes maior nos casos em relação aos controles. Em estudo caso-controle realizado em São Paulo com crianças menores de um ano GOMES *et al* (1991) recuperaram enteropatógenos em 58% das fezes de lactentes com diarreia e 13% dos controles, o que representa uma prevalência 4,2 vezes maior nos casos do que nos controles. OGUNSANYA *et al.* (1994) estudando crianças menores de cinco anos, encontraram para casos e controles, percentuais de 74,9% e 28%, respectivamente. O percentual de isolamento de enteropatógenos em diferentes estudos é bastante variável, pois adultos e crianças podem apresentar quadro típico de diarreia infecciosa mesmo na ausência de um microorganismo identificável, além disso, a incapacidade de se isolar algum agente das fezes não demonstra, certamente, que a doença não seja de origem infecciosa, pois o indivíduo pode não estar eliminando-o naquele momento ou o laboratório limitou a pesquisa a determinados agentes. Dos vários testes realizados em laboratórios de microbiologia, as coproculturas e parasitológicos de fezes são responsáveis por altos custos e dispendem horas de trabalho do pessoal técnico. Portanto, apesar do número crescente de agentes etiológicos conhecidos como causadores de diarreia, os laboratórios, na sua maioria, centraliza seus procedimentos de isolamento para os microorganismos classicamente envolvidos. Daí a importância destes procedimentos em estudos epidemiológicos, a fim de que estas informações sejam utilizadas para se guiar as rotinas médicas, laboratoriais e de equipes de saúde (HINES & NACHAMKI, 1996; SHERMAN *et al.*, 1996).

No presente estudo, observou-se que bactérias foram isoladas em 63% dos casos diarreicos e em 11,3% dos controles, enquanto que protozoários foram

encontrados em 15% dos casos e em 1% dos controles. Em todas as análises foram encontradas diferenças significantes, quando se comparou a predominância de agentes etiológicos encontrados no grupo diarreico em relação ao controle.

A predominância da etiologia bacteriana em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento têm sido comprovada em diferentes estudos (BARLOW *et al.*, 1999; RICHARDSON *et al.*, 1998; BRUNSER *et al.*, 1997; NOTARIO *et al.*, 1996; GRACEY, 1996; CAPRIOLI *et al.*, 1996; OGUNSANYA *et al.*, 1994). Chama a atenção porém, o alto percentual de isolamento de *G. lamblia* e *E. hystolítica* no presente estudo, particularmente entre crianças menores de um ano de idade, motivo de discussão a seguir.

A maioria dos trabalhos não tem conseguido demonstrar diferenças importantes desses parasitas nos grupos diarreicos e controle (TOPOROVSKI *et al.*, 1999; SUWATANO, 1997; BRUNSER *et al.*, 1997; TOPOROVSKI, 1996; CAPRIOLI *et al.*, 1996; FARTHING, 1996; LA VIA, 1994; LOMAZI *et al.*, 1993; MAGALHÃES *et al.*, 1990; ANANTHAN *et al.*, 1989). Neste estudo porém, foram encontrados *G. lamblia* em 27 (9,3%) dos casos e 3 (1%) dos controles, uma prevalência 9 vezes maior nos casos em relação aos controles ($p < 0,01$), *E. hystolítica* foi encontrado em 17 (5,8%) dos casos e em nenhum controle. Sabe-se que estes parasitas atingem um grande número de pessoas, sobretudo em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias são inadequadas, sendo a água e os alimentos importantes veículos de contaminação (FARTHING, 1996; BRUNSER *et al.*, 1997). No presente estudo a maioria dos domicílios era servida pela rede pública de abastecimento de água. Contudo, 85% dos casos que foram positivos quanto ao encontro de enteroparasitas nas fezes (dados não

mostrados) não ingeriram água fervida ou filtrada durante os 30 dias anteriores a doença diarreica, o que sugere poder ter sido a água um veículo de contaminação desses patógenos.

Prevalência de enteropatógenos

Muitos estudos têm evidenciado a importância da variação de enteropatógenos em diferentes regiões, de acordo com a estação do ano, a população estudada (urbana ou rural), as classes sócio-econômicas, a localização geográfica e a idade do hospedeiro. A maioria destes estudos abrange larga faixa de idade e dados de apenas parte do ano, portanto não devem ser considerados em levantamentos epidemiológicos. Neste sentido, poucos são os estudos que incluem casos suficientes de uma mesma fonte geográfica, em grupos de idade restritos, que pesquisem a maioria dos mais importantes patógenos (GOMES *et al.*, 1991; 1989).

Dentre os agentes bacterianos investigados, encontrou-se diferenças significantes entre os casos e controles quanto ao isolamento de todos os agentes pesquisados, sendo ambos mais freqüentes nas crianças com diarreia. Achados semelhantes são encontrados na maioria dos estudos realizados em países em desenvolvimento, muito embora em percentuais variáveis na dependência de fatores já anteriormente considerados (SOUZA *et al.*, 2000; TOPOROVSKI *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 1998, TOWNES *et al.*, 1997; NOTARIO *et al.*, 1996; OGUNSANYA *et al.*, 1994; OLIVA *et al.*, 1992; AMORIM *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1991; FAGUNDES-NETO *et al.*, 1989). EAEC foi enteropatógeno mais

freqüentemente isolado nas fezes diarréicas (25,5%), achado importante que demonstra alta relação desta categoria de *E. coli* com a doença diarreica nesta região, visto que foi isolada em apenas 8,2% dos controles, uma prevalência 3,1 vezes maior nos casos do que nos controles. Entretanto, em outros estudos ocorreram em um número considerável de portadores assintomáticos, não mostrando relação com a doença diarréica (KESKIMAKI *et al.*, 2001, SOUZA *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 1998; CRAVIOTO *et al.*, 1991; WANKE *et al.*, 1991)

Contudo, relatos associando EAEC à diarréia demonstram que essa categoria pode ser considerada um patógeno emergente (OKEKE, 2001; KAPER e NATARO, 1998; BOUZARI *et al.*, 1994; HAIDER *et al.*, 1991). No Brasil, dois estudos realizados no Estado de São Paulo, demonstraram uma associação significativa de EAEC com a diarréia aguda. Rodrigues *et al.*, 2002, estudando 54 pacientes (1 a 13 anos de idade) com diarréia na cidade de Botucatu - SP, recuperou em 41% dos casos EAEC nas amostras fecais. Scaltsky *et al.*, 2002, em estudo pareado caso-controle com 100 pares de lactentes menores de 1 ano de idade na cidade de São Paulo - SP, identificou 20% de EAEC nos casos e 3% nos controles ($p < 0,01$). Essa discordância pode ser devida a diferentes metodologias empregadas na detecção de EAEC ou ainda, estar relacionada a fatores do hospedeiro, como idade, diferenças sócio-econômicas, estado nutricional e imunológico (LAW; CHART, 1998). Além disso, esses estudos ao contrário dos demais, foram realizados recentemente, o que pode evidenciar a emergência desse patógeno na etiologia da diarréia aguda.

Os sorotipos mais freqüentes foram o O3:H2 (8 amostras) e O39:H49 (5 amostras), contudo observamos uma diversidade de sorotipos nas amostras de EAEC. Esses dados corroboram com a literatura internacional que relata o caracter heterogêneo dessa categoria de *E. coli*, no que se refere a diversidade de sorotipos (OKEKE & NATARO, 2001).

O percentual de positividade para EPEC, isolada em 11% das amostras das crianças com diarreia aguda pode ser considerado inferior a maioria dos achados em países em desenvolvimento, onde a ocorrência de EPEC pode se situar entre 21% a 42% (NOTARIO *et al.*, 1996; FAGUNDES-NETO *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1991; SILVA, 1991; GOMES *et al.*, 1989; FAGUNDES-NETO *et al.*, 1989). Porém têm-se observado um decréscimo nesse percentual, como o observado por Almeida *et al.* (1998), em São José do Rio Preto - SP, Lomazi *et al.* (1993), em Paulínia – SP, Rodrigues *et al.*, 2004 e Scaletsky *et al.* (2002) em Natal - RN, que identificaram a bactéria em 10,7%, 7,0% e 11,6% dos casos, respectivamente, dados que se aproximam dos encontrados neste estudo. Além disso, a maioria das EPEC isoladas no presente trabalho (8,6%) foi constituída de cepas atípicas, isto é, sem o plasmídio EAF mas com o padrão de adesão localizado-like em 6 horas de ensaio.

Não foi observado predominância de determinado sorotipo entre as amostras de EPEC. Encontramos porém, uma diversidade de sorotipos nessas amostras, principalmente entre as caracterizadas como atípicas.

Amostras de EPEC atípicas têm sido implicadas como agentes de diarreia (HEDBERG *et al.*, 1997; SCOTLAND *et al.*, 1993; VILJANEN *et al.*, 1990), enquanto

há outros estudos que não têm demonstrado essa associação (ECHEVERRIA *et al*, 1991; GOMES *et al*, 1989; LEVINE *et al*, 1988).

Neste estudo foi demonstrado que amostras de EPEC atípicas têm significativa associação com diarreia aguda. Levine *et al* (1985), em uma pesquisa realizada com voluntários, demonstraram que EPEC atípica é capaz de causar diarreia menos severa que a causada por EPEC típica. Assim, é possível que este grupo de bactérias, mesmo sendo desprovido do plasmídio de virulência EAF, ainda tenha a capacidade de causar diarreia. Esta suposição é concordante com a pesquisa de Viljanen *et al* (1990) na Finlândia, que descreveram um surto (aproximadamente 700 pessoas envolvidas entre adultos e crianças) de diarreia causado por uma amostra de EPEC atípica. Contudo, mais estudos são necessários para se estabelecer o papel desempenhado pelas EPEC atípicas na doença diarreica.

A frequência de isolamento de ETEC foi de 10,0% nas crianças com diarreia e de 2,8% nos controles, uma prevalência 3,6 vezes maior nos casos quando comparados aos controles ($p < 0,01$), dados idênticos aos observados por Gomes *et al* em 1991 na cidade de São Paulo (6,6% nos casos e 1,8% nos controles). Os principais sorotipos de ETEC identificados no presente estudo foram o O6:H16 e ONT:H-. Segundo Wolf (1997) os sorogrupos mais comuns incluem O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O114, O115, O128ac, O148, O153, O159 e O167. A exemplo do que ocorre em outros grupos enteropatogênicos de *E. coli*, ETEC pertence a sorotipos específicos, alguns de ocorrência universal, como O6:H16, O8:H9, O25:H42, O27:H7, O29:H21, O78:H12, O128:H12, O148:H28 e O153:H45; enquanto que outros estão restritos a determinadas

regiões geográficas. Contudo, uma maior diversidade de sorotipos tem sido observada em amostras produtoras apenas de LT-I (WOLF, 1997).

É interessante mencionar que apesar da diversidade de sorotipos de ETEC, alguns antígenos flagelares são característicos de alguns poucos sorogrupos, os quais geralmente estão associados aos fenótipos toxigênicos LT-I/ST-I e ST-I, encontrados em associação significativa com diarreia. Portanto, a identificação do antígeno flagelar de amostras de ETEC, auxilia e orienta em muitos casos a identificação do sorogrupo dessas amostras (WOLF, 1997; GUTH *et al.*, 1985, 1989).

EIEC foi isolado em 5 (2,6%) casos e em nenhum controle. A maioria (4) em crianças menores de 1 ano de idade. Trabalhos realizados em São Paulo também demonstraram baixa frequência deste agente, variando de 0,9% a 2,3% (GOMES *et al.*, 1991; TRABULSI, 1990; KITAGAWA, 1989). Porém, observamos que a faixa etária predominantemente acometida nesta casuística foi a dos menores de 1 ano, dados considerados altos quando comparados a outros achados em países em desenvolvimento, onde a ocorrência de EIEC ocorre em maior número em crianças com idade superior a 1 ano (SOUZA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 1998; FAGUNDES-NETTO *et al.*, 1995; GOMES *et al.*, 1991).

Segundo Kapper & Nataro (1998), esse grupo de microrganismo pertence a sorotipos bem definidos, a saber: O28:H⁻, O29:H⁻, O112AC:H⁻, O121:H⁻, O124:H⁻, O124:H30, O135:H⁻, O136:H⁻, O143:H⁻, O144:H⁻, O152:H⁻, O164:H⁻, O167:H⁻ e O173:H⁻. Nesta casuística foram identificados cinco amostras de EIEC que pertencem aos sorotipos O152:H⁻ (2) e O29:H⁻ (3).

Salmonella sp foi encontrada em 23 casos (7,9%) e em nenhum controle. O sorotipo mais prevalente foi Saintpaul, identificado em 13 casos (4,5%), seguido por Typhimurium com 8 casos (2,8%) além de *S. Enteritidis* e *S. enterica sub enterica* (4,5,12:eh:-), ambos identificados em um caso cada um.

Vários trabalhos realizados no Brasil evidenciaram *Salmonella sp* como segundo agente bacteriano mais freqüente nas diarreias agudas em crianças, principalmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, variando de 8,0% a 19,0% respectivamente (GOMES *et al*, 1991; KITAGAWA, 1989; TOLEDO, 1983). Em trabalhos mais recentes observou-se um percentual menor de infecções diarreicas causadas por este agente, como os encontrados por Almeida em 1998 e Toporovsky em 1999. Scaletsky *et al*, em 2002, estudando crianças com até 2 anos de idade na cidade de Natal - RN, isolou *Salmonella sp* em apenas 3 casos diarreicos em 1 controle, dados considerados inferiores aos achados no presente estudo.

Essa variação na prevalência de *Salmonella sp* pode ser devida às condições de saneamento básico, água e esgoto, prática de preparo de alimentos e do próprio clima.

O sorotipo Saintpaul foi o mais prevalente nessa população, dados discordantes dos encontrados em na cidade de São Paulo que relata o sorotipo typhimurium como o mais freqüente (GOMES *et al*, 1991, 1989).

A infecção por *Shigella* é um dos maiores problemas de saúde pública em crianças que vivem em países em desenvolvimento, onde se observa um agravamento do quadro com febre alta, cólicas abdominais intensas, prostração e desinteria (PCKERNG, 1981; DUPONT, 1970). *Shigella sp* foi identificada em 12

casos (4,1%) e em nenhum controle, sendo *S. flexneri* 5 o sorotipo mais prevalente (6 casos) seguido por *S. sonnei* (4 casos) e *S. flexneri* 1 (2 casos). Dados concordantes com a literatura nacional, que relata a ocorrência desses sorotipos na diarreia aguda (ALMEIDA *et al*, 1998; GOMES *et al*, 1991, KITAGAWA, 1989).

Estudos realizados em São Paulo - SP, por Gomes *et al* (1991) e Kitagawa *et al* (1989) encontraram *Shigella sp* em fezes diarreicas em 3,1% e 12,0% de suas casuísticas, respectivamente. Este agente foi o patógeno mais freqüente nas fezes diarreicas de crianças menores de cinco anos em São José do Rio Preto - SP, tendo sido isolado em 21,0% das fezes diarreicas.

Campylobacter sp também foi isolado no grupo diarreico, em 7 casos (2,4%) e em nenhum controle, sendo que a maioria 4,9% foi isolado dos lactentes menores de 1 ano de idade. Devido a dificuldades técnicas poucos estudos nacionais fazem referência a *Campylobacter sp* termofílico em suas casuísticas, o que dificulta a comparação entre os mesmos. A baixa incidência encontrada de *Campylobacter sp* nesta casuística está em concordância com trabalhos publicados no Brasil (TOPOROVSKY, *et al* 2004; LOMAZI *et al*, 1993), que relatam o isolamento deste agente em 3% a 5% dos pacientes, respectivamente.

Dificuldades técnicas não permitiram a identificação de todos os agentes conhecidos e que promovem diarreia aguda, o que pode ter diminuído os percentuais de positividade na casuística. Dentre esses, se destaca o Rotavírus por sua freqüência, normalmente alta (21,5%) (SKALETISKY *et al*, 2002.) Este agente foi pesquisado em apenas 60 casos diarreicos dos 290 pacientes estudados no presente trabalho, tendo sido identificado em 12 casos (20%), uma

prevalência bastante significativa. Estes dados sugerem que a prevalência de Rotavirus deva ser equivalente a outras regiões do país. Novos estudos na região deverão incluir a pesquisa deste agente.

Os percentuais de isolamento de enteropatógenos encontrados neste estudo sobrepõe a maioria dos observados em estudos nacionais. Essa alta prevalência, provavelmente, é devida a equipe de profissionais envolvida, que permitiu uma seleção de casos e controles apropriados. A cooperação entre a equipe e os pacientes, assegurou uma coleta adequada, conservação da amostra e o pareamento sistematizado da casuística. Todos esses fatores colaboraram, sem dúvida, para os altos índices de isolamento dos agentes etiológicos encontrados nesta pesquisa.

Segundo dados fornecidos pelo Laboratório de Meteorologia da UFPB, os índices pluviométricos da Cidade de João Pessoa, entre os anos de 2000 a 2001, em média, de 326 mm para os meses de abril a setembro e de 46,4 mm para os meses de outubro a março, com médias de temperaturas de 26,4°C e 28°C respectivamente. Portanto, apesar de não haver grandes variações na temperatura local, pode-se afirmar que o período chuvoso corresponde aos meses de abril a setembro e o de estiagem aos meses de outubro a março. Contudo, a frequência de distribuição dos patógenos não sofreu interferência climática, com exceção de *Campylobacter* sp., mais prevalente no período chuvoso ($p < 0,001$). A maior ocorrência de protozoários, EAEC, EPEC, ETEC, EIEC, *Shigella* sp e *Salmonella* sp no período de estiagem não foi considerada estatisticamente significativa.

Prevalência de enteropatógenos segundo faixa etária

EPEC, *Campylobacter sp* e Parasitas foram prevalentes nas crianças com idade superior a 1 ano, com significância estatística quando comparados ao grupo dos menores de 1 ano ($p < 0,01$). Esse fato talvez se deva a uma maior interação dessas crianças com o ambiente. Nessa fase os mesmos começam a dar seus primeiros passos e portanto a exposição a outras fontes de contaminação ocorrem de forma mais intensa, ou simplesmente esses microrganismos têm uma preferência por essa faixa etária.

Com relação a EPEC, sabe-se que esse patógeno é mais freqüentemente encontrado nos menores de 1 ano (GOMES *et al*, 1991,1989). Nessa casuística, esse agente foi encontrado 1,2 vezes mais em lactentes do grupo I do que naqueles do grupo II, dados esses concordantes com outros estudos realizados em nosso meio (SCALETSKY *et al*, 2002;ALMEIDA *et al*, 1998;GOMES *et al*,1991,1989)

Um dado que nos chamou atenção foi a quase totalidade de isolamento de EIEC (4/80%) nos indivíduos com até 1 ano de idade. Resultado que difere de outros trabalhos que relatam a predominância de EIEC nas crianças com idade superior a 1 ano. Esses dados indicam que diferenças e hábitos próprios dessa população possam estar influenciando na prevalência de EIEC nessa faixa etária ou que talvez a própria mãe ou outros portadores possam estar transmitindo estes microrganismos à criança.

Com relação aos demais patógenos, todos foram isolados em ambos os grupos etários, porém, não apresentaram predominância estatisticamente significativa em nenhum deles.

Infecções Mistas

O isolamento de mais de um agente foi encontrado em 32 (11%) dos 290 pacientes com diarreia, e em nenhum controle, diferença estatisticamente significativa, demonstrando que as infecções mistas foram realmente mais relacionadas a diarreia. Dados que coincidem com a maioria dos trabalhos consultados (SCALETSKY *et al*, 2002; SOUZA *et al*, 2001; ALMEIDA *et al*, 1998; TOPOROVSKY, 1996; FAGUNDES NETTO *et al*, 1995; GOMES *et al*, 1991). Estes estudos foram conduzidos em populações pertencentes à classe sócio-econômica baixa, onde há uma elevada carência protéico-energética e as condições sanitárias são deficientes, o que provavelmente pode ter contribuído para o isolamento de mais de um patógeno nessas casuísticas. Contudo, o isolamento de mais de um patógeno nas fezes dessas crianças não significa necessariamente que todos os agentes encontrados estejam exercendo sua ação patogênica ao mesmo tempo e desta maneira determinando infecções mais graves, mas que essas crianças podem estar servindo como portadores de vários enteropatógenos ou estarem sendo expostos aos mesmos continuamente.

Manifestação clínicas

No presente trabalho observou-se a ocorrência de manifestações clínicas e suas relações com os agentes enteropatogênicos, analisando-se apenas as crianças com diarreia que apresentaram isolamento bacteriano único. Várias tentativas de se correlacionar determinados agentes a variáveis clínicas e epidemiológicas têm sido feitas a fim de se relacionar a sintomatologia com um patógeno específico. É importante ressaltar que um grande impedimento na confiabilidade das evidências observadas por diferentes autores é o alto percentual de infecções mistas apresentados nos estudos, o que prejudicou a análise dos dados (CAPRIOLI *et al*, 1996; SUWATANO, 1997).

A ocorrência de sinais e sintomas apresentados no quadro diarreico pode sofrer interferências de acordo com a casuística estudada: crianças recrutadas em comunidade, pacientes ambulatoriais ou submetidos à internação hospitalar. Essas diferenças podem resultar quadros de maior ou menor gravidade.

Neste estudo, observando-se pacientes provenientes de ambulatório e serviço de terapia de reidratação oral e considerando-se o isolamento de apenas um agente etiológico nos casos analisados, muco foi a manifestação mais associada à diarreia (66,3%), seguido de febre (53%), vômito (53%) e sangue nas fezes (13%). Em outros estudos nacionais, os percentuais da ocorrência de vômitos foram de 42,1% a 80% e de febre, 8,8% a 67,0% (FAGUNDES-NETO *et al.*, 1989; GOMES *et al*, 1991; SILVA, 1991; TOPOROVSKI, 1996). Não foi verificada a presença de muco nas fezes nessas casuísticas o que impossibilita

comparações. Deve ser ressaltado que EAEC foi o agente menos relacionado ao vômito e febre, estando altamente associado à presença de muco nas fezes.

Um fato digno de nota é o uso de fármacos, incluindo antibióticos, no tratamento da diarreia aguda. Sabe-se que os mesmos têm pouca utilidade nessa patologia (GRACEY, 1996), porém estes ainda têm sido indiscriminadamente prescritos para essa população por indicação médica (dados não mostrados). Além de muitos episódios não responderem a este tratamento, por serem de etiologia viral, muitas das bactérias entéricas são resistentes a determinados antibióticos, os quais podem prolongar o estado de portador (como é o caso da *Salmonella*), e interferir na flora microbiana intestinal, sem contar com os efeitos colaterais e o aumento de custos (GRACEY, 1996). A Organização Mundial de Saúde recomenda o uso de antibiótico apenas para os casos de disenteria, diarreia persistente e suspeitas de cólera com desidratação grave (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Fatores de Risco

Estudos sobre os fatores que contribuem para a ocorrência da diarreia aguda têm sido realizados no Brasil (SILVA *et al*, 2004; FUCHS & VICTORA, 2002; VÁZQUEZ *et al*, 1999; GOMES, 1992; VICTORA *et al*, 1988). Estes estudos relatam a influência direta dos fatores sócio-econômicos e demográficos na ocorrência de doença diarreica. A importância de cada fator envolvido varia de acordo com as características da população estudada. No presente estudo foram analisadas diferentes formas de cuidado da criança fora do lar, a permanência em

sua residência, a exposição a animais domésticos, ao leite (materno, de cabra e de vaca em pó), a água fervida, sexo e renda familiar. Verificamos a relação entre esses fatores e doença diarreica de qualquer etiologia bacteriana. Sendo EAEC o patógeno predominante nos casos em relação aos controles foi possível relacionar os mesmos fatores de risco com este microrganismo isoladamente, dados até o momento não abordados em estudos anteriores.

Exposição a diferentes cuidados à criança

Verificamos que dentre as diferentes formas de assistência à criança fora do lar, as creches estão associadas com um risco relativo 2,2 vezes maior de aquisição de doença diarreica por qualquer patógeno bacteriano e 5,2 vezes maior quando nos referimos a EAEC. Crianças que receberam cuidados em outra residência, tiveram risco relativo (RR) de aquisição de diarreia, por qualquer agente bacteriano, 4,7 vezes mais do que aquelas não expostas a esses cuidados. O mesmo não foi observado quando a diarreia era causada por EAEC, que apresentou RR estatisticamente não significativa.

No entanto, a permanência da criança na sua própria residência pode ser considerado como fator de proteção, tanto para diarreia causada por qualquer agente bacteriano quanto para aquela causada apenas por EAEC, com risco relativo de 0,2 para ambos os casos.

O risco de disseminação das infecções gastrintestinais nas creches pode ser atribuído a vários fatores, como o aglomerado de crianças de baixa idade, altamente susceptíveis a processos infecciosos, já que nessa fase os cuidados da criança com a sua higiene pessoal ainda são precários (RAMOS, 1991). Soma-se

a isso, as deficiências individuais de cada estabelecimento, como falta de pessoal treinado no atendimento, superlotação, ausência de normas de prevenção a doenças infecciosas, entre outras (KARASIC, 1987; LEMP *et al*, 1984).

Exposição a aglomerado

A disseminação de diversos microrganismos enteropatogênicos ocorre amiúde dentro do ambiente familiar (ECHEVERRIA, 1985). Entretanto, não é obrigatório que a fonte de infecção seja o familiar doente. A presença de mais de uma pessoa no mesmo domicílio pode implicar em um veículo de contaminação comum para todos, ou ainda, ser apenas um reflexo das condições ambientais e de higiene pessoal deficientes.

As crianças que residiam em casas com mais de três pessoas exibiam um risco 2,2 vezes maior de desenvolver diarreia aguda de qualquer etiologia bacteriana, quando comparado àquelas que residiam com menos de 3 pessoas no mesmo domicílio. O dobro desse valor foi observado para aquelas crianças que residiam em casas onde mais de três pessoas ocupavam o mesmo dormitório (RR = 4,2).

Analisando esta variável, temos que levar em consideração outros aspectos como deficiência no saneamento, na higiene pessoal, condições econômicas e do nível de educação dos pais. Estes fatores podem interferir diretamente no desenvolvimento da diarreia e portanto mascarar a real influência do aglomerado como risco de aquisição de diarreia.

Quando se analisou a presença de mais de três pessoas habitando o mesmo domicílio e mais de três pessoas no dormitório e o risco de desenvolver

diarréia aguda por EAEC individualmente, observamos que o RR foi respectivamente, 5,9 e 6,8 vezes maior de aquisição de diarréia aguda do que naqueles não expostos ao aglomerado. Portanto, a presença de mais de três pessoas na mesma casa ou no mesmo dormitório demonstrou estar influenciando na aquisição de diarréia principalmente quando está for causada por EAEC.

Renda Familiar

A renda familiar tem influência direta nas condições de saúde e sobrevivência infantil, uma vez que dela depende o acesso à educação, serviços de saúde de qualidade e condições adequadas de vida e moradia.

Quando se estudou essa variável, sendo esta dividida entre os que recebiam um total de até dois salários mínimos e os que recebiam acima desse valor em reais (R\$). A renda familiar, incluindo a contribuição para as despesas de todas as pessoas residentes no domicílio, foi significativamente menor nos casos do que nos controles e o RR de aquisição de diarréia foi 3,3 e 5,7 vezes maior nas famílias com renda menor que dois salários mínimos do que naquelas com rendimento superior a esse valor quando a diarréia foi causada por qualquer agente bacteriano e por EAEC, respectivamente.

Fagundes-Neto *et al* (1995) estudando lactentes com diarréia em Brasília, encontraram média de renda mensal igual a 2,9 salários-mínimos, em contraste a 10,9 salários-mínimos dos indivíduos controles, havendo significativa diferença entre os dois grupos. Victora, Barros, Feachem (1989) em Pelotas (RS), observaram que quanto menor a renda familiar, maior o número de episódios de hospitalização e mortalidade por diarréia.

Blake *et al* (1993), estudando 500 latentes menores de um ano de idade, em São Paulo, observaram que a baixa renda familiar constitui fator de risco para a ocorrência de diarreia (OR=1,8).

Muito embora o perfil sócio-econômico seja de difícil avaliação nos diferentes estudos, é evidente a estreita correlação entre a baixa renda mensal, más condições de moradia e baixo nível de escolaridade, repercutindo sobre a ocorrência de diarreia.

Exposição a animais

Os animais domésticos podem ser considerados como reservatórios e fonte de transmissão de enteropatógenos (ORDWAY, 1960). Em nossa casuística, observamos que a exposição aos mesmos se configurou como fator de risco com risco 4,8 vezes maior de aquisição de diarreia por qualquer agente bacteriano do que nos indivíduos não expostos a esta variável. O mesmo ocorreu quando analisamos a diarreia causada exclusivamente por EAEC que apresentou um risco 2,9 vezes maior de aquisição de diarreia nos expostos do que naqueles não expostos ($p = 0,029$).

Exposição à água fervida

Como a grande maioria dos domicílios era servida pela rede pública de abastecimento de água, analisamos a influência do hábito de ferver a água antes da ingestão pela criança. Foram comparadas aquelas que sempre bebiam água fervida com aquelas que nunca o faziam.

Verificamos que o hábito de ferver a água antes de sua ingestão pela criança mostrou-se um fator protetor contra a aquisição de diarreia aguda seja aquela causada por EAEC ou por qualquer patógeno bacteriano (RR de 0,3 e 0,1 respectivamente).

É possível que a água tenha sido veículo para os enteropatógenos e sua contaminação pode ter ocorrido em qualquer local, desde a estação de tratamento até a chegada aos domicílios ou com maior probabilidade durante a estocagem em vasilhames ou outros recipientes mal protegidos. A fervura da água teria como resultado a eliminação dos microrganismos enteropatogênicos contaminantes.

Vale lembrar que o hábito de fervura da água é um indicador direto da preocupação da mãe em relação à saúde, ou ainda das condições de higiene pessoal e ambiental, dentro de cada residência. Assim, a mãe que tem o cuidado de sempre ferver a água pode ser aquela que também lava as mãos antes de manipular os alimentos, acondicioná-los apropriadamente e estocá-los devidamente (STATON, *et al*, 1987), procedimentos que estão associados à queda da morbidade por diarreia.

Leite materno

Em nosso estudo, encontramos um RR de 0,2 e 0,1 para aquisição de diarreia por qualquer agente bacteriano e aquela causada por EAEC respectivamente, para crianças maiores de 1 ano. Dados também encontrados para os menores de 1 ano, com RR de 0,03 e 0,1 respectivamente. Demonstrando o papel protetor do leite materno, independente da idade. O mesmo fato ocorre, porém com intensidade menor, quando analisamos o consumo de leite de cabra,

com risco relativo igual a 0,2 para diarreia causada por qualquer patógeno bacteriano, contudo na diarreia causada apenas por EAEC o mesmo não ocorre.

Quando analisamos a ingestão de leite em pó de forma exclusiva pelos lactentes, observamos que os mesmos apresentam um risco relativo de 4,3 e de 9,75 vezes maior de aquisição de diarreia por qualquer etiologia bacteriana e por EAEC, respectivamente, do que aqueles não expostos a essa variável. O que se configura como um forte fator de risco na aquisição da doença diarreica principalmente quando analisamos a diarreia causada por EAEC.

As evidências de que o leite materno confere proteção significativa contra diarreia e minimiza seus efeitos nutricionais adversos podem ser comprovadas em diferentes estudos realizados, sobretudo, em países em desenvolvimento (RAMOS, 1991; VICTORA *et al.*, 1989; BROWN *et al.*, 1989; RESEARCH *et al.*, 1989; MONDAL *et al.*, 1996; WATERLOW, 1996; JASON *et al.*, 1984; FEACHEM & KOBLINSKY, 1984)

No Peru, Brown *et al.* (1989), acompanhando 153 recém-nascidos até um ano de idade, demonstraram que lactentes não alimentados exclusivamente com leite materno apresentavam maior risco para diarreia quando comparados a lactentes com alimentação natural exclusiva, sobretudo na faixa etária de zero a seis meses.

Mondal *et al.*, em 1996, demonstraram, através de estudo realizado em 148 lactentes com idade inferior a 2 meses e acompanhados até 1 ano, que o uso e o estímulo ao aleitamento materno exclusivo têm importante papel na redução da incidência de diarreia, em comunidade rural da Índia.

Em 1999, Clemens *et al.* evidenciaram a importância de se alimentar os recém-nascidos precocemente com leite materno para se prevenir ou diminuir a ocorrência de diarreia nos primeiros seis meses de vida. Os autores observaram que as crianças que iniciavam uso de leite materno até 3 dias após o nascimento tinham redução de 26% no número de episódios de diarreia em relação àqueles alimentados após este período, atribuindo este papel provavelmente às propriedades protetoras do colostro humano utilizado no grupo que recebeu alimentação precoce.

No Brasil, Victora *et al.* (1989) observaram, em estudo caso-controle, que lactentes que não recebiam leite materno apresentaram chance proporcional 14,2 vezes maior de evolução para o óbito por diarreia do que aqueles alimentados exclusivamente com leite materno. Já aqueles que recebiam leite de vaca em adição ao leite materno apresentavam 4,2 vezes mais esta ocorrência. O risco de morte por diarreia entre os lactentes abaixo de dois meses de vida não amamentados ao seio foi de 23,3 vezes, quando comparados ao grupo da mesma idade e alimentados com leite materno (com ou sem suplementação não-láctea). Acima desta faixa, tal risco foi 5,3 vezes.

Outros estudos realizados em países em desenvolvimento, como Bangladesh (BRIEND, WOJTYNIAK, ROWLAND, 1988), Guiné-Bissau (MOLBAK *et al.*, 1994), Índia (SACHDEV *et al.*, 1991), Ruanda (LEPAGE, MUNYAKAZI, HENNART, 1981) e Sri Lanka (PERERA *et al.*, 1999), também evidenciaram o importante papel protetor do aleitamento materno contra a morbimortalidade por diarreia em crianças.

A associação da ausência de leite materno e a ocorrência de diarreia demonstra a importância do aleitamento materno para os lactentes, sobretudo em idade abaixo de seis meses. Portanto, o estímulo à alimentação natural (exclusiva) até os seis meses de vida deve estar sempre em evidência como estratégia para a prevenção da diarreia, particularmente em regiões com condições sanitárias precárias e populações de baixo nível sócio-econômico, como acontece nos países em desenvolvimento.

Para finalizar, ressalta-se a importância deste estudo para o melhor conhecimento das características da diarreia aguda em nosso meio, por trazer relevantes contribuições acerca dos dados clínicos, epidemiológicos e etiológicos, até então não estudados nesta capital.

Para diminuição efetiva da morbidade e mortalidade por diarreia seria necessário a adoção de políticas de saúde que priorizem a atenção à criança, a melhoria da condição educacional da população, assim como do seu nível sócio-econômico.

6. CONCLUSÃO

A cooperação dos profissionais envolvidos na seleção dos casos, coleta e processamento de amostras contribuiu efetivamente para o isolamento de um grande número de microrganismos enteropatogênicos.

Nesse estudo demonstramos que EAEC está associada com diarreia aguda em crianças menores de 2 anos. Sendo a exposição ao leite de vaca em pó o fator de risco mais relacionado à diarreia causada por esse patógeno. Ao contrário, os principais fatores protetores foram: o leite materno e a água fervida.

O segundo patógeno mais freqüente foi EPEC, porém a maioria dos isolados foram EPEC atípicas.

Nas infecções mistas a associação mais freqüente foi entre EAEC e *Salmonella sp*, ocorrendo em 6 pacientes, seguida por EPEC atípica e EAEC, ocorrendo em 5 casos.

Observamos que somente *Campylobacter sp* apresentou sazonalidade (estatisticamente significativa).

Em estudos posteriores, a pesquisa de rotavírus e o acompanhamento nutricional dos pacientes devem ser incluídos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M.T.G *et al.* Enteropatógenos associados com diarreia aguda em crianças. **J Pediatría**, Rio de Janeiro, v. 4, p. 291-298, 1998.

AMATO-NETO, V. & CORREA, L.L. – Exame parasitológico das fezes. 5.ed. São Paulo, Sarvier, p.92, 1992.

AMORIM, R.J.M. *et al.* Diarreia aguda associada a *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) em crianças menores de 2 anos na Cidade do Recife. **J Pediatría**, Rio de Janeiro, 68 n. 1/2, p. 54-57, 1992.

ANANTHAN, S. *et al.* Studies on the pathogenicity of classical enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from acute diarrhoea among children 0-5 years of age. **Indian J Pathol Microbiol**, India, v.3, p. 198-206, 1989.

BARBOOUR, M.C.; NICHOLS, C.R.; FUKUSHIMA, T. An outbreak of giardiasis in a group of campers. **Am J. Trop. Med. Hyg.**, v. 25(3), p. 384-389, 1976.

BARLOW, R.S. *et al.* A novel serotype of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) as a major pathogen in an outbreak of infantile diarrhoea. **J Med Microbiol**, v. 48 n.12, p.1123-1125, 1999.

BAUDRY, B. *et al.* A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. **J Infect Dis**, Chicago, v.161, p.1249-1251, 1990.

BERN, C. *et al* The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a ten-year update. **Bull WHO**, Atlanta, v.70, p. 705-714, 1992.

BLACK, R.E. – Persistent diarrhea in children of developing countries. **J Pediatr Infect Dis**, v.12 n. 9, p. 751-761, 1993.

BOUZARI, S. *et al.* Adherence of non-enteropathogens *Escherichia coli* to HeLa cells. **J. Med. Microbiol.** v. 40 n. 2 p. 95-97, 1994.

BRIEND, A.; WOJTYNIAK, B.; ROWLAND, M.G.M. - Breast feeding, nutritional state, and child survival in rural Bangladesh. **BMJ**, v. 296, p. 879-882, 1988.

BROWN, K.H.*et al.* Infant-feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. **Pediatrics**, v. 83, p. 31-40, 1989.

BRUNSER, O.; ESPINOZA, J.; BRUNSER, A.M. – Etiology of diarrhea: bacteria and parasites. In: GRACEY, M. & WALKER-SMITH, J.A. – Diarrheal Disease. Nestlé Nutrition Workshop Series, Philadelphia, Vevey/Lippincot-Raven Publishers, v.38, p.13-37,1997.

CAMPOS, G.J.V *et al* Morbimortalidade infantil por diarréia aguda em área metropolitana da região Nordeste do Brasil, 1986 – 1989. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.26, p. 132-139, 1995.

CAPRIOLI, A. *et al* Enteropathogens associated with childhood diarrhea in Italy. **J Pediatr Infect Dis**, Washington, v.15, p. 876-883, 1996.

CARVALHO, R.L.B. – *Escherichia coli* enteroaderente e diarréia aguda e persistente em crianças: um estudo prospectivo de casos e controles em São Paulo. São Paulo, 2000. [Tese - Doutorado - Universidade Federal de São Paulo]

CLARKE, S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* - an emerging problem?, Diagnostic Microbiology and Infectious disease, **Elsevier**, v.41,p. 93-94, 2001.

CLEMENS, J. *et al.* Early initiation of breastfeeding and risk of infant diarrhea in rural Egypt. **Pediatrics**, v. 104 n 1, p 3, 1999.

CRAVIOTO, A. *et al.* Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of

human colostrum and breast milk. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.163, p.1247-1255, 1991.

DULBECCO, R. & VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **J Exp Med**, v.99, p.167-182, 1954.

ECHEVERRIA, P. D. *et al* Attaching and effacing of enteropathogenic *Escherichia coli* as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. **J. Infect. Dis.**, v. 164 p 550-554, 1991.

ECHEVERRRIA, P. D. *et al*. A comparative study of enterotoxigenic *E. coli*, *Shigella*, *aeromonas* and *Vibrio* as etiologies of diarrhea in Northeastern Thailand. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.** v 34 p 547-554, 1985

ESREY, S.A.; FEACHEM, R.G.; HUGHES, J.M. - Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: improving water supplies and excreta disposal facilities. **Bull WHO**, Gêneva, v. 63, p.757-772, 1985.

ESREY, S.A. - Water, waste and well-being: a multicountry study. **Am J Epidemiol**, v.143, p.608-23, 1996.

EWING, W.H.; **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae**. 4th ed. New York, Elsevier Science Publishing Co., Inc., 1986.

FAGUNDES-NETO, U.*et al*. Diarréia aguda: evolução clínica em crianças. **Rev Paul Pediatr**, São Paulo, v.7 n. 24, p.27-33, 1989.

FAGUNDES-NETO, U. & PENNA, F.J. Diarréia Aguda. In: FAGUNDES-NETO, U.; PENNA, F.J.; WEHBA, J. - **Gastroenterologia Pediátrica**. 2.ed. Rio de Janeiro, Medsi, p. 163-177, 1991.

FAGUNDES-NETO, U. *et al*. Enteropathogenic *Escherichia coli* O111ab:H2 penetrates the small bowell epithelium in na infant with acute diarrhoea. **Acta Paediatr**, v. 84, p. 453-455, 1995.

FANG, G.D *et al.* Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, caso-control study. **J. Pediatric Gastroenterol. Nutr.**, v. 21, p. 137-144, 1995.

FARTHING, M.J.G. – Acute diarrhea: pathophysiology. In: GRACEY, M. & WALKER-SMITH, J.A. – Diarrheal Disease. Nestlé Nutrition Workshop Series. v.38. Philadelphia, Vevey/Lippincott-Raven Publishers, p. 55-73, 1997.

FARTHING, M.J.G. – Parasitic and fungal infections of the digestive tract. In: WALKER, W.A.; DURIE, P.T.; HAMILTON, J.R.; WALKER-SMITH, J.A.; WATKINS, J.B. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. 2.ed. St. Louis, Mosby, 1996. p.664-76.

FEACHEM, R.G. & KOBLINSKY, M. - Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: promotion of breast-feeding. **Bull WHO**, v. 62, p. 271-291, 1984.

FERNANDEZ, H.; TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L. R. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in diarrhoea and non-diarrhoea children in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.26 n.2, p.150-153, 1984.

FUCHS, S.C.; VICTORA, C.G. Risk and prognostic factors for diarrheal disease in Brazilian infants: a special case-control design application. **Cad. Saude Pública**. v 18 n 3 p. 773-783, 2002.

GALVÃO, C.E.S. *et al* Terapia de reidratação oral para diarreia aguda em região do nordeste do Brasil, 1986-1989. **Rev Saúde Pública**, São Paulo, v.28 n.6, p.416-422, 1994.

GIRON, J.A. *et al* Distribution of the bundle forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 168, p. 1037-1041, 1993.

GOMES, T.A.T. *et al.* Adherence patterns and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolates from children with and without Diarrhea in São Paulo city, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 36 n. 12. p. 3609-3613, 1998.

GOMES, T.A.T. *et al* Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, Chicago, v.160, p.131-135, 1989.

GOMES, T.A.T. *et al*. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, Chicago, v.164, p. 331-337, 1991.

GONZALES, Z. *et al*. Isolamento de *Campylobacter fetus ssp. Jejuni* em crianças normais e com diarreia. **J. Pediatr.**, v. 57 n 2, p. 127-129, 1984.

GORTER, A.C.*et al*. Hygiene behaviour in rural Nicaragua in relation to diarrhoea. **Int J Epidemiol**, v. 27 n. 6, p.1090-1100, 1998.

GRACEY, M. - Diarrhea and malnutrition: a challenge for pediatricians. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 22, p. 6-16, 1996.

GUERRANT, R.L. *et al*. Prospective study of diarrheal illnesses in Northeastern Brazil: Patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. **J. Infect. dis.**, Chicago, v.148, p. 986-997, 1983.

GUERRANT, R.L. Principles and syndromes of enteric infection. In: MANDELL, G.L. *et al*. Principles and practice of infectious diseases. New York, Churchill Livingstone, p. 837-850. 1990.

GUERRANT, R.L. BOBAK, D.A. Bacterial and Protozoal gastroenteritis, **N. Engl. J. Med.** v. 325 n 5, p. 327-340, 1991.

GUTH, B. E. C. *et al*. Enterotoxin production, presence of colonization factor antigen I, and adherence to HeLa cells by *Escherichia coli* 0128 strains belonging to different O subgroups. **Infect. Immun.**, Washington, v. 47, p. 338-340, 1985.

GUTH, B. E. C. *et al*. Virulence factors and biochemical characteristics of serotypes of *Escherichia coli* serogroup 029. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, p. 2161-2164, 1989. HAIDER, K.*et al* Enteroaggregative *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children : clinical and microbiological features. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v. 9, p. 318-322, 1991.

HAIDER, K. *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* infections in Bangladeshi children: clinical and microbiological features. **J. Diarrhoeal Dis. Res.** v. 9. n. 4. p 318-322, 1991.

HANSON, L.A.; ZORIC, M.; BERNDEN, M. - Breast-feeding: overview and breast milk immunology. **Acta Paediatr Jpn**, v. 36, p. 557-561, 1994.

HINES, J. & NACHAMKI, I. – Effective use of clinical microbiology laboratory for diagnosing diarrheal disease. **Clin Infect Dis**, v. 23, p. 1292-1301, 1996.

HOWIE, P.W. *et al.* Protective effect of breast feeding against infection. **BMJ**, v. 300, p.11-16, 1990.

HUTTLY, S.R.A.; MORRIS, S.S.; PISANI, V. - Prevention of diarrhoea in young children in developing countries. **Bull WHO**, v.75 n. 2, p.163-174,1997

JASON, J.M.; NEIBURG, P.; MARKS, J.S. - Mortality and infectious disease associated with infant feeding practice in developing countries. **Pediatrics**, v. 74, p. 702-727, 1984.

JERSE, A.E.*et al.* A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc Natl Acad Sci, U.S.A.**, v.87, p. 7839-7843, 1990.

KARASIC, R.M. Infections in Day-care centers: etiology, prevalence and management. **Adv. Pediatr. Infect. Dis.** v.2 p. 12-34, 1987.

KESKIMAKI, M. *et al.* EPEC, EAEC and STEC in stool specimens: Prevalence and molecular epidemiology of isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 40, p. 151-156, 2001.

KITAGAWA, S.M.S *et al.* Etiologia da diarréia infecciosa endêmica da criança de baixo nível sócio-econômico em São Paulo. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 7 p. 16-25, 1989.

KODOVSKY, O. & THORNBURG, W. - Hormones in milk. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 6, p. 172-196, 1987.

- LA VIA, W.V. Parasitic Gastroenteritis. **Pediatric Annals**, v. 23, p. 556-560, 1994.
- LEMP, G.F. *et al.* The relationship of staff to the incidence of diarrhea in day-care centers. **Am. J. Epidemiol.** v. 120. p. 750-758, 1984.
- LEPAGE, P.; MUNYAKAZI, C.; HENNART, P. Breastfeeding and hospital mortality in children in Rwanda. **Lancet**, v.1, p. 409-411, 1981.
- LEVINE, M.M. - *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J Infect Dis**, Chicago, v.155 (3), p.377-389, 1987.
- LEVINE, M.M. *et al.* The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J Infect Dis**, Chicago, v. 152, p. 550-559, 1985.
- LEVINE, M.M. *et al.* Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. **J Infect Dis**, Chicago, v.158 n. 1, p. 224-228, 1988.
- LIMA, A.A.M. *et al.* Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta. Paediatr. Suppl.**, v. 381, p. 39-44, 1992.
- LOMAZI, E.A. *et al.* Identificação de agentes enteropatogênicos nas fezes de crianças com diarreia aguda no município de Paulínia – SP. **J Pediatría**, Rio de Janeiro, v. 69 n. 3, p. 159-164, 1993.
- MAFFEI, H.V.L. *et al.* Nutritional management and weight changes during hospitalization of brazilian infants with diarrhoea. Primary reliance on oral feeding or continuous nasogastric drip with locally made, modulated minced chicken formula. **J Trop Pediatr**, v. 36 n. 5, p. 240-246, 1990.
- MAGALHÃES, M. *et al.* Microbiologia da diarreia aguda endêmica em crianças no Recife. **Revista do IMIP**, v. 4 n. 1, p. 23-28, 1990.
- MARTINEZ, M.B. Enteropatógenos como agentes de etiologia clínica humana. **Rev. ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 17, p. 57-76, 1996.

MASS, R. An improved colony hybridization method with significanty sensitivity for detection of single genes. **Plasmid**, v.10, p. 296-298, 1983.

MATHAN, V.I. – Diarrhoeal diseases. **Br Med Bull**, v. 54 n. 2, p. 407-419, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Assistência e controle das doenças diarréicas**. 3.ed. Brasília, MS/Secretaria da Assistência à Saúde/Coordenação Materno-Infantil, p. 44, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Mortalidade proporcional por doença diarréica aguda em menores de 5 anos**. MS/FNS/CENEPI/Anuário estatístico sobre mortalidade infantil, 2002.

MOLBAK, K. *et al.* Prolonged breastfeeding, diarrhoeal disease, and survival of children in Guinea-Bissau. **BMJ**, v. 308 n. 6941, p. 1403-1406, 1994.

MOLBAK, K.*et al.* Risk factor for diarrheal disease incidence in early childhood: a community cohort study from Guinea-Bissau. **Am J Epidemiol**, v. 146 n. 3, p. 273-282, 1997.

MONDAL, S.K. *et al.* Occurence of diarrhoeal diseases in relation to infant feeding practices in a rural community in West Bengal, India. **Acta Paediatr**, v. 85, p. 1159-1162. 1996

MOON, H.W. *et al.* Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect Immun**, Washington v. 41, p.1340-1351, 1983.

MOSELEY, S.L. *et al.* Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* by DNA colony hibridization. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 142, p. 892-898, 1980.

MOSELEY, S.L. *et al.* Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hibridization using three enterotoxin gene probes. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 145, p. 863-869, 1982.

NATARO, J.P. *et al.* Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J Infect Dis**, Chicago, v.152, p. 560-565, 1985.

NATARO, J.P. *et al.* Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. **Pediatr Infect Dis J**, v.6 n. 9, p. 829-831, 1987.

NATARO, J.P.*et al.* T84 cells culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect immun.**, Washington, v. 64, p. 4761-4768, 1996.

NATARO, J.P.; KAPER, J. B. :Diarrheagenic *Eschechia coli*. **Clin. Microbiol Rev.**, Washington, v.11 n. 1, p.142-201, 1998.

NEWLAND, J.W.; NEILL, R.J. DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin converting bacteriophages. **J. Clin. microbiol.**, v. 26, p. 1292-1297, 1988.

NOTARIO, R.*et al.* Species and serovars of enteropathogenic agents associated with acute diarrheal disease in Rosario, Argentina. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 38 n. 1, p. 5-7, 1996.

OGUNSANYA, T.I.; ROTIMI, V.O.; ADENUGA, A. A study of the aetiological agents of childhood diarrhoea in Lagos, Nigeria. **J Med Microbiol**, v. 40 n. 1, p. 10-14, 1994.

OKEKE, I.N.; NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Lancet**, vol 1, p. 304 - 312, 2001

OLIVA, C.A.G.*et al.* Diarréia aguda grave associada a *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC): características clínicas e perdas fecais em lactentes hospitalizados. **Rev Assoc Med Bras**, v. 43 n. 4, p. 283-289, 1992.

ORDWAY, N.K. Diarrhoeal disease and its control. **Bull WHO**. v. 23 p. 73-101, 1960.

ORLANDI, P.P *et al.* Enteropathogens associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96 n. 5, p. 621-625, 2001.

PAVAN, M.F.B; MAMIZUKA, E.M.; MARTINEZ, M.B. *Campylobacter enteritis* in São Paulo, Brazil In: Ruiz-Palacios, G.M. *et al.* *Campylobacter*. Instituto Nacional de la Nutricion. "Salvador Zubirán", México, p. 5-8, 1991.

PAUL, M. *et al.* The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 117, p. 319-326, 1994..

PERERA, B.J. *et al.* The impact of breastfeeding practices on respiratory and diarrhoeal disease in infancy: a study in Sri Lanka. **J Trop Pediatr.** v. 45 n. 2, p.115-118, 1999.

PESSOA, S.B. & MARTINS, A.V. – Parasitologia Médica. 11.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 872, 1988.

PLEVRIS, J.N. & HAYES, P.C. – Investigation and management of acute diarrhoea. **Br J Hosp Med**, v.56 (11), p.569-573, 1996.

PRATICE parameter: the management of acute gastroenteritis in young children. **Pediatrics**, v.97, p. 424-433, 1996.

RAMOS, S.R.S.T. Doença diarreica em São Paulo: Prevalência de *Escherichia coli* enteropatogênica Clássica nas fezes de lactentes com e sem diarreia. Importância dos fatores de risco e proteção. São Paulo, 1991. [Tese - Doutorado - Universidade de São Paulo]

RAVIDIN, J. I.; Amebiasis. **Clin. Infect. Dis.** v. 20, p.1453 a 1466, 1995.

RESEARCH on improving infant feeding practices to prevent diarrhoea or reduce its severity: Memorandum from a JHU/WHO meeting. **Bull WHO**, v. 67, p. 27-33, 1989.

RIBEIRO-JR, H. – Diarrheal disease in a developing nation. **Am J Gastroenterol**, v. 95 n. 1 : S14-5, 2000.

RICHARDSON, S. *et al.* Extended excretion of rotavirus after severe diarrhoea in young children. **Lancet**, v. 351 n. 9119, p. 1844-8, 1998.

RILEY, L.W. *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New Engl. J. Med.**, v.308, p. 681-685, 1983.

RODRIGUES, J. *et al.* Prevalence of diarrheogenic *Escherichia coli* and rotavirus among children from Botucatu, São Paulo state, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 1311-1318, 2002.

RODRIGUES, J. *et al.* Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian Infants. **J. Clin. Microbiol.** v. 42. n.1, p. 398 - 400, 2004.

ROWLAND, M.G.M.; LEUNG, T.S.M.; MARSHALL, W.C. - Rotavirus infection in young Gambia village children. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v.74, p. 663-665, 1980.

SACHDEV, H.P.S. *et al.* Does breastfeeding influence mortality in children hospitalized with diarrhoea? **J Trop Pediatr**, v.37, p.275-279, 1991.

SALYERS, A. A. & WHITT, D. D. Bacterial Pathogenesis. A molecular approach. 1ª ed., Washington D. C. , **American Society for Microbiology**, 1994.

SANTOSHAN, M. - Status of oral rehydration therapy after 25 years of experience. In: GRACEY, M. & WALKER-SMITH, J.A. - Diarrheal Disease. v.38. Nestlé Nutrition Workshop Series. Philadelphia, Vevey/Lippincott-Raven Publishers, p. 91-108, 1997.

SCALETISKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect Immun.** Washington, v.45, p. 534-536, 1984.

SCALETISKY, I.C.A. *et al.* Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotypes and bioserotypes of *Escherichia coli*. **Infect Immun**, Washington, v. 49, p. 528-32, 1985.

SCALETISKY, I.C.A. et al. EPEC adherence to Hep-2 cells. **Rev Microbiol**, v.27 n. 1, p. 58-62, 1996.

SCALETISKY, I.C.A. et al. A localized adherence-like Pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect Immun**. v. 67 n.7, p. 3410-3415, 1999.

SCALETISKY, I.C.A. et al. Diffusely adherent *Escherichia coli* as a cause of acute Diarrhea in young children in northeast Brazil: a case-control study. **J. Clin. Microbiol**. Washington, v.40, p. 645-648, 2002.

SCHREK, R. – A method for counting the viable cells in normal and in malignant cells suspensions. **Amer J Cancer**, v.28, p. 389-392, 1936.

SCOTLAND, S. M. et al. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O26, O55, O111 and O128 isolated in the United Kingdom in 1991 from patients with diarrhoea. **Epidemiol. Infect.**, v. 111 p. 429-38, 1993.

SENA, L.V. – Conhecimento das mães sobre reidratação oral e dosagem de sódio em soluções sal-açúcar preparadas em domicílios da periferia de centro urbano do Nordeste do Brasil. São Paulo, 1999. [Tese - Mestrado - Universidade Federal de São Paulo]

SILVA, G.A.P. – Diarréia aguda associada a *Escherichia coli* enteropatogênica clássica em lactentes de baixas condições sócio-econômicas na cidade do Recife. Estudo clínico e microbiológico. São Paulo, 1991. [Tese - Doutorado - Escola Paulista de Medicina]

SILVA, G.A.P. et al. Fatores de risco para doença diarreica no lactente: um estudo caso-controle. **Cad. Saude Publica**.. v. 20, n. 2, p. 589-595, 2004.

SILVA, R.M. & GOMES, T.A.T. – Probes: what are they? Their applications in microbiology, medicine, and basic research. **Rev Hosp S Paulo – Esc Paul Med**, São Paulo, v.5 n. 1/2, p.1-10, 1994.

SHERMAN, P.M.; PETRIC, M.; COHEN, M.B. – Gastroenterocolites infecciosas em crianças: atualização dos patógenos emergentes. In: LEBENTHAL, E. (Red.) – **Clínicas Pediátricas da América do Norte. Gastroenterologia Pediátrica II**. Rio de Janeiro, Interlivros, v. 2, p.383-398, 1996.

SKIRROW, M.B. *Campylobacter enteritis: a “new” disease.* **Br. Med. J.** v.2 n. 6078, p. 9-11, 1977.

SMALL, P.L.C.; FALCOW, S. Development of a DNA probe for the virulence plasmid of *Shigella* spp and enteroinvasive *Escherichia coli*. In: L. Leive (ed.). Microbiology. American Society for microbiology, Washington, D. C., 1986.

SNYDER, J.D. & MERSON, M.H. - The magnitude of the global problem of acute diarrheal disease: a review of active surveillance data. **Bull WHO**, v.60: 605-613, 1982.

SNYDER, J.D. – Bacterial diarrhea. In: WALKER, W.A.; DURIE, P.T.; HAMILTON, J.R.; WALKER-SMITH, J.A.; WATKINS, J.B. **Pediatric Gastrointestinal Disease**. 2.ed. St. Louis, Mosby, p. 645-654, 1996.

SODEMANN, M. *et al.* Maternal perception of cause, signs and severity of diarrhoea in a suburban West African community. **Acta Paediatric**, v. 85, p.1062-1069, 1996.

SOUZA, E.C. *et al.* Perfil etiológico das diarreias agudas de crianças atendidas em pronto atendimento de hospital regional da cidade de São Paulo. **J. pediatria**, Rio de Janeiro, v.78 n. 1, p. 31-38, 2002.

SUWATANO, O. Acute diarrhea in under five-year-old admitted to King Mongkut Prachomklao Hospital, Phetchaburi Province. **J Med Assoc Thai**, v. 80, n. 1, p. 26-32, 1997.

TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *E. coli* and results of the Sereny test. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.17, p. 419-421, 1983.

TOMKINS, A.M. – Recents developments in the nutritional management of diarrhoea. 1. Nutritional strategies to prevent diarrhoea among children in developing countries. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 85, p. 4-7, 1991.

TOPOROVSKI, M.S. – Diarréia aguda em crianças menores de três anos de idade: aspectos clínicos, epidemiológicos e etiológicos. São Paulo, 1996. [Tese - Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo]

TOPOROVSKI, M.S *et al.* Diarréia aguda em crianças menores de 3 anos de idade: recuperação de enteropatógenos nas amostras fecais de pacientes comparadas com a de grupo controle. **J Pediatría**, Rio de Janeiro, v.75 n. 2, p. 97-104, 1999.

TOWNES, J.M. *et al.* Etiology of bloody diarrhea in bolivian children: implications for empiric therapy. **J Infect Dis**, v. 175, p. 1527-1530, 1997.

VASQUEZ, M.L. *et al.* Incidência e fatores de risco de diarréia e infecções respiratórias agudas em comunidades urbanas de Pernambuco, Brasil. **Cad Saúde Pública**, São Paulo, v.15 n. 1, p. 163-171, 1999.

VICTORA *et al.* Influence of birth weight on mortality from infectious diseases: a case-control study. **Pediatrics**, v. 81, p. 807-811, 1988.

VICTORA, C.G. *et al.* Infant feeding and deaths due to diarrhea. A case-control study. **Am J Epidemiol**, v.129 n. 5, p. 1032-1041, 1989.

VILJANEN, M. K. *et al.* Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v. 336 p. 831-834, 1990.

WANKE, C.A.*et al.* Potential role of adherence traits of *Escherichia* in persistent diarrhea in a urban Brazilian slum. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 10, p. 746-751, 1991.

WATERLOW, J.P. – Lactancia materna y destete. In: WATERLOW, J.P. – Malnutrición Proteico-Energética. Washington, OPS, p. 319-355, 1996.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, p. 569-584, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Persistent diarrhea in children in developing countries. Memorandum from a WHO meeting. **Bull WHO**, v.66 (6), p. 709-17, 1988.

WHO, www.who.int. Inform causes of child death, acesso 01 de Janeiro de 2004.

8. ANEXOS

Anexo I

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Eu, _____,

Responsável pelo menor, _____,

Fui informado(a) que vou responder um questionário e que será colhido material clínico para realização de exame de fezes e de sangue de meu filho(a) para saber qual a bactéria que está causando a sua doença (casos) ou verificar se meu filho(a) é portador de germes que causam diarreia, mesmo não tendo a doença e se ele tem fatores de defesa em seu sangue(controles)

Esses exames serão utilizados em trabalho Epidemiológico desenvolvido pela Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, laboratório de Microbiologia Clínica da FCF/USP, Núcleo de Medicina Tropical/UFPB, para conhecimento das bactérias que causam diarreia em crianças e qual o mecanismo que está envolvido no processo.

Fui informado(a) que se houver recusa de minha parte para coleta dos exames não haverá qualquer prejuízo para o tratamento de meu(minha) filho(a), que terá seu atendimento médico realizado da mesma forma.

João Pessoa, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável

Anexo II

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DOENÇA DIARRÉICA (CASO):

Definição de caso: Crianças menores de 2 anos, com diarreia (maior ou igual a três evacuações de fezes não formadas ou aquosas/ dia), por até sete dias.

A. Informações Demográficas

Código _____ No. _____
 Nome _____
 Idade(no começo da diarreia) ____/____/____
 sexo: Masc. ____ Fem. ____
 endereço _____
 Código _____

B. Informações Clínicas

Data desta visita: ____/____/____ Data do início da diarreia : ____/____/____

duração da diarreia _____(dias)

C. Informações Epidemiológicas

- O paciente foi hospitalizado (por outra causa desde o nascimento) nos últimos 30 dias que antecederam esta doença diarreica?

Sim () Não () Desconhece ()

Se Sim:

1. Nome do hospital da mais recente internação _____

2. Motivos da internação : a. diarreia ()

b. outros () Qual _____

c. desconhece ()

3. Quantos dias ficou no hospital? _____

4. Quantos dias antes do início da diarreia a criança recebeu alta?

- Algum membro da família foi hospitalizado nas duas semanas que antecederam o início da diarreia deste caso?

Sim () Não () Desconhece ()

Se Sim: completar a seguir, para cada membro da família que foi hospitalizado:

Parentesco com o paciente Idade sexo Hosp. por diarreia?

_____	_____	_____	S	N	D
_____	_____	_____	S	N	D
_____	_____	_____	S	N	D

Diarreia nas duas semanas antes do início da diarreia deste caso? S N D

S N D

S N D

Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes do início deste caso de diarreia? () Sim () Não () desconhece

Se Sim, completar a seguir, para cada membro da família que apresentou diarreia:

Parentesco com o paciente idade sexo

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

5. Que tipo de instalação sanitária existe na casa da criança?

Tipo: Sim Não Desconhece

a. banheiro na casa _____

b. fossa na casa _____

- c. latrina fora de casa _____
- d. Outra (especificar) _____

Se tem banheiro,

a. onde é o sanitário da família?

_____ dentro de casa

_____ fora

_____ ambos

_____ outro _____

_____ desconhece

b. o sanitário é usado por outras famílias?

() sim

() não

() desconhece

c. Há água corrente dentro do sanitário?

() sim

() não

() desconhece

d. Você vê água servida saindo do seu sanitário, a céu aberto, perto de sua casa?

() sim

() não

() desconhece

6. Qual o leite que a criança estava tomando durante as duas semanas que precederam o início da diarreia? Sempre Geralmente Raramente Nunca Desconhece

Leite de peito: _____

Leite de vaca: _____

Leite de cabra: _____

Leite em pó(int.) _____

Outro(Qual?) _____

Adiciona água

ao leite: _____

Se sim,

É fervida? _____

É filtrada? _____

É tratada? _____

7. Nos sete dias anteriores ao início da diarreia, a criança recebeu algum alimento na mamadeira? em casa ou em outro local? () sim () não () desco.

Se sim,

a. Algumas vezes quando você prepara a mamadeira para o seu bebê, ele não toma todo o conteúdo da mamadeira. O que você faz?

a. _____joga fora o resto

b. _____Guarda para mais tarde

c. _____outra, explique _____

d. _____desconhece

8. Quero saber algumas coisas sobre a limpeza de partes da mamadeira. Após usar a mamadeira, como você geralmente limpa o bico da mamadeira?

sim

não

desconhece

lava com água _____

lava com sabão _____

ferve o bico _____

outra () _____

(. Após usar, a mamadeira, como você geralmente limpa a mamadeira (além do bico)?

lava com água _____

lava com sabão _____

ferve a mamadeira _____

outra, () _____

9. Muitas pessoas não entendem como é difícil cuidar de uma criança pequena, preparar a comida e cuidar da casa. Frequentemente não há tempo para fazer tudo isso. Vou fazer algumas perguntas sobre algumas coisas que a mãe muito ocupada, pode não ter tempo de fazer. Você me dirá se faz algumas vezes estas coisas ou sempre, habitualmente, ou nunca:

a. Quando uma criança evacua e você a limpa, você lava suas mãos após?

() sempre () habitualmente () às vezes () nunca () desconhece

b. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

() sempre () habitualmente () às vezes () nunca () desconhece

c. Após você usar o sanitário você lava as suas mãos?

() sempre () habitualmente () às vezes () nunca () desconhece

10. A criança usa chupeta?

() sim () Não () desconhece

11. A criança começou a receber qualquer alimento que ela nunca havia ingerido, nos sete dias anteriores ao início da diarreia? (como: novo leite, fruta, carne, legumes, sucos, etc)

() sim () não () desconhece

se sim, nome do(s) alimento(s): _____

12. A criança tomou algum antibiótico nos sete dias antes do início desta diarreia?

() Sim () Não () Desconhece

Se sim,

Quanto dias antes da doença iniciou o tratamento? _____

Quanto dias antes da doença interrompeu o tratamento? _____

Completar a seguir, para cada antibiótico usado:

Nome do antibiótico: _____ Por que Via? Oral, injetável, ambas, desconhece

_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

13. A criança tomou algum antibiótico para essa diarreia?

() Sim () Não () Desconhece

Se sim,

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____

Que data o tratamento terminou? ____/____/____

(Se está em uso de antibióticos, usar a data de hoje para o término do tratamento)

14. Nos sete dias que antecederam a diarreia, a criança foi cuidada durante o dia por?

	Sim	Não	desconhece
Na creche?	_____	_____	_____
Em outra casa com crianças de outras casas	_____	_____	_____
Outra situação fora de casa?	_____	_____	_____
Na sua casa por pelo menos quatro dias	_____	_____	_____

Se a criança esteve na creche, quantas crianças havia em média?

2-4	5-9	10-14	15-19	20-29	30-39
40-49	50-59	60-99	+100	desconhece	

15. Qual foi a fonte de **água de beber** na casa da criança na semana antes do início da diarreia?

	Sim	Não	Desconhece
Água encanada municipal	_____	_____	_____
Água de rio	_____	_____	_____
Água de garrafa	_____	_____	_____

Água de poço _____
 Água de chuva _____
 Outra _____

16. A água que esta criança bebe, é colocada em algum recipiente antes de consumi-la?

() sim () Não () desconhece

se sim,

_____ vasilha _____ filtro _____ outros, _____

se vasilha ou filtro, eles são tampados habitualmente ou não?

() sim () não () desconhece

as pessoas colocam o copo diretamente no vasilhame para pegar a água?

() sim () não () desconhece

17. Há na casa da criança algum animal de estimação ou outro?

Animal S N D O animal entra em casa? Ficou doente nas duas nas
duas semanas antes deste caso?

	S	N	D	S	N	D
Cão	—	—	—	—	—	—
Gato	—	—	—	—	—	—
Galinha	—	—	—	—	—	—
Outro	—	—	—	—	—	—

Especificar _____

Se ficou doente, Qual o tipo da doença?

Diarréia? S _____ N _____ D _____

Outras _____

Desconhece _____

18. Quantas pessoas dormem na casa? _____

19. Em quantos quartos dormem essas pessoas? _____

20. Qual é a renda total (aproximadamente) mensal? valores em R\$

Menor que um salário mínimo _____

Acima de um salário mínimo _____

Acima de dois salários mínimos _____

Acima de três salários mínimos _____

Acima de quatro salários mínimos _____

Entre cinco e dez salários mínimos? _____

Desconhece _____

21. Para crianças menores de trinta dias no início desta doença diarréica:

Onde a criança nasceu? Hospital _____ casa _____ Outro _____

Se nasceu no Hospital ou procurou hospital no primeiro dia de vida, Qual Hospital _____

Número de dias no hospital _____

Em que tipo de alojamento ficou a criança?

Cuidados especiais _____

Prematuro _____

Normal _____

Outro _____ (especificar)

Desconhece _____

Presença de Sinais Clínicos:

Sintomas	S	N	D
Febre	—	—	—
Vômito	—	—	—
Desidratação	—	—	—

Presença de sangue nas fezes _____

Informações Laboratoriais :

Data da obtenção da amostra ____/____/____

Tipo de amostra de fezes coletada fezes____ swab____

Foram isoladas amostras de algum patógeno? S____ N____

Se sim, especifique: _____

Resistente a algum antibiótico? S____ N____

Se sim,

_____ resistente a um ou mais antibióticos

Especificar: _____

Nome do controle _____

Quem fez a entrevista? _____

Anexo III

QUESTIONÁRIO PARA ESTUDO DE DOENÇA DIARRÉICA (CONTROLE)

Definição de controle: Pacientes sem sinais ou sintomas gastrointestinais nos últimos 30 dias, de grupo etário semelhante ao do paciente com doença diarreica aguda, ou, idade na visita clínica. Queremos saber se cada exposição (ex. hospitalização, consumo de água ou alimento suspeito) aconteceu durante o período especificado antes do início da doença aguda ou, se não tem doença aguda, a data da visita.

A. Informações Demográficas

Código _____ No. _____
 Nome _____
 Idade(no começo da doença) ____/____/____
 sexo: Masc. ____ Fem. ____
 endereço _____
 Código _____

B. Informações Clínicas

Data desta visita: ____/____/____ Data do início da doença : ____/____/____

duração da doença _____(dias)

C. Informações Epidemiológicas

- O paciente foi hospitalizado (por outra causa desde o nascimento) nos últimos 30 dias que antecederam esta doença?

Sim () Não () Desconhece ()

Se Sim:

1. Nome do hospital da mais recente internação _____

2. Motivos da internação : a. diarreia ()
 b. outros () Qual _____
 c. desconhece ()

3. Quantos dias ficou no hospital? _____

4. Quantos dias antes do início da diarreia a criança recebeu alta?

- Algum membro da família foi hospitalizado nas duas semanas que antecederam o início da doença deste caso?

Sim () Não () Desconhece ()

Se Sim: completar a seguir, para cada membro da família que foi hospitalizado:

Parentesco com o paciente	Idade	sexo	Hosp. por diarreia?		
_____	_____	_____	S	N	D
_____	_____	_____	S	N	D
_____	_____	_____	S	N	D

Diarreia nas duas semanas antes do início da doença deste caso? S N D

S N D
 S N D

Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes do início deste caso de doença? () Sim () Não () desconhece

Se Sim, completar a seguir, para cada membro da família que apresentou diarreia:

Parentesco com o paciente	idade	sexo
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

5. Que tipo de instalação sanitária existe na casa da criança?

Tipo: Sim Não Desconhece

a. banheiro na casa _____

- b. fossa na casa _____
- c. latrina fora de casa _____
- d. Outra (especificar) _____

Se tem banheiro,

a. onde é o sanitário da família?

_____ dentro de casa

_____ fora

_____ ambos

_____ outro _____

_____ desconhece

b. o sanitário é usado por outras famílias?

() sim

() não

() desconhece

c. Há água corrente dentro do sanitário?

() sim

() não

() desconhece

d. Você vê água servida saindo do seu sanitário, a céu aberto, perto de sua casa?

() sim

() não

() desconhece

6. Qual o leite que a criança estava tomando durante as duas semanas que precederam o início da doença? Sempre Geralmente Raramente Nunca Desconhece

Leite de peito: _____

Leite de vaca: _____

Leite de cabra: _____

Leite em pó(int.) _____

Outro(Qual?) _____

Adiciona água

ao leite: _____

Se sim,

É fervida? _____

É filtrada? _____

É tratada? _____

7. Nos sete dias anteriores ao início da doença, a criança recebeu algum alimento na mamadeira? em casa ou em outro local? () sim () não () desco.

Se sim,

a. Algumas vezes quando você prepara a mamadeira para o seu bebê, ele não toma todo o conteúdo da mamadeira. O que você faz?

a. _____ joga fora o resto

b. _____ Guarda para mais tarde

c. _____ outra, explique _____

d. _____ desconhece

8. Quero saber algumas coisas sobre a limpeza de partes da mamadeira. Após usar a mamadeira, como você geralmente limpa o bico da mamadeira?

sim

não

desconhece

lava com água _____

lava com sabão _____

ferve o bico _____

outra () _____

(. Após usar, a mamadeira, como você geralmente limpa a mamadeira (além do bico)?

lava com água _____

lava com sabão _____

ferve a mamadeira _____

outra, () _____

9. Muitas pessoas não entendem como é difícil cuidar de uma criança pequena, preparar a comida e cuidar da casa. Frequentemente não há tempo para fazer tudo isso. Vou fazer algumas perguntas sobre algumas coisas que a mãe muito ocupada, pode não ter tempo de fazer. Você me dirá se faz algumas vezes estas coisas ou sempre, habitualmente, ou nunca:

a. Quando uma criança evacua e você a limpa, você lava suas mãos após?

() sempre () habitualmente () às vezes () nunca () desconhece

b. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

() sempre () habitualmente () às vezes () nunca () desconhece

c. Após você usar o sanitário você lava as suas mãos?

() sempre () habitualmente () às vezes () nunca () desconhece

10. A criança usa chupeta?

() sim () Não () desconhece

11. A criança começou a receber qualquer alimento que ela nunca havia ingerido, nos sete dias anteriores ao início da doença? (como: novo leite, fruta, carne, legumes, sucos, etc)

() sim () não () desconhece

se sim, nome do(s) alimento(s): _____

12. A criança tomou algum antibiótico nos sete dias antes do início desta doença?

() Sim () Não () Desconhece

Se sim,

Quantos dias antes da doença iniciou o tratamento? _____

Quantos dias antes da doença interrompeu o tratamento? _____

Completar a seguir, para cada antibiótico usado:

Nome do antibiótico:

Por que Via? Oral, injetável, ambas, desconhece

13. A criança tomou algum antibiótico para essa doença?

() Sim () Não () Desconhece

Se sim,

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____

Que data o tratamento terminou? ____/____/____

(Se está em uso de antibióticos, usar a data de hoje para o término do tratamento)

14. Nos sete dias que antecederam a doença, a criança foi cuidada durante o dia por?

Sim Não desconhece

Na creche? _____

Em outra casa com crianças de outras casas _____

Outra situação fora de casa? _____

Na sua casa por pelo menos quatro dias _____

Se a criança esteve na creche, quantas crianças havia em média?

2--4 _____ 5--9 _____ 10--14 _____ 15--19 _____ 20--29 _____ 30--39 _____

40--49 _____ 50--59 _____ 60--99 _____ +100 _____ desconhece _____

15. Qual foi a fonte de água de beber na casa da criança na semana antes do início da doença?

Sim Não Desconhece

Água encanada municipal _____

Água de rio _____

Água de garrafa _____

Água de poço _____
 Água de chuva _____
 Outra _____

16. A água que esta criança bebe, é colocada em algum recipiente antes de consumi-la?

() sim () Não () desconhece

se sim,

_____ vasilha _____ filtro _____ outros, _____

se vasilha ou filtro, eles são tampados habitualmente ou não?

() sim () não () desconhece

as pessoas colocam o copo diretamente no vasilhame para pegar a água?

() sim () não () desconhece

17. Há na casa da criança algum animal de estimação ou outro?

Animal S N D O animal entra em casa? Ficou doente nas duas nas
duas semanas antes deste caso?

Animal	S	N	D	O animal entra em casa?	S	N	D	Ficou doente nas duas nas duas semanas antes deste caso?
Cão	—	—	—	—	—	—	—	—
Gato	—	—	—	—	—	—	—	—
Galinha	—	—	—	—	—	—	—	—
Outro	—	—	—	—	—	—	—	—
Especificar _____								

Se ficou doente, Qual o tipo da doença?

Diarréia? S _____ N _____ D _____

Outras _____

Desconhece _____

18. Quantas pessoas dormem na casa? _____

19. Em quantos quartos dormem essas pessoas? _____

20. Qual é a renda total (aproximadamente) mensal? valores em R\$

Menor que um salário mínimo _____

Acima de um salário mínimo _____

Acima de dois salários mínimos _____

Acima de três salários mínimos _____

Acima de quatro salários mínimos _____

Entre cinco e dez salários mínimos? _____

Desconhece _____

21. **Para crianças menores de trinta dias no início desta doença doença:**

Onde a criança nasceu? Hospital _____ casa _____ Outro _____

Se nasceu no Hospital ou procurou hospital no primeiro dia de vida, Qual Hospital _____

Número de dias no hospital _____

Em que tipo de alojamento ficou a criança?

Cuidados especiais _____

Prematuro _____

Normal _____

Outro _____ (especificar)

Desconhece _____

Presença de Sinais Clínicos:

Sintomas	S	N	D
Febre	—	—	—
Vômito	—	—	—
Desidratação	—	—	—

Presença de sangue nas fezes _____

Informações Laboratoriais :

Data da obtenção da amostra ____/____/____

Tipo de amostra de fezes coletada fezes____ swab____

Foram isoladas amostras de algum patógeno? S____ N____

Se sim, especifique: _____

Resistente a algum antibiótico? S____ N____

Se sim,

_____ resistente a um ou mais antibióticos

Especificar: _____

Nome do caso _____

Quem fez a entrevista? _____

Anexo IV

- **Solução desnaturante**

NaOH (Merck)	0,5 N
--------------	-------

NaCl (Merck)	1,5 M
--------------	-------

Esta solução é preparada em água destilada a partir de soluções – estoque de NaOH a 10 N e de NaCl a 5 M.

- **Solução neutralizante**

Tampão Tris – pH 7,0	1 M
----------------------	-----

NaCl (Merck)	2 M
--------------	-----

Esta solução é preparada em água destilada a partir de soluções - estoque de tampão Tris (2 M), pH 7,0 e NaCl (5 M).

Anexo V

- Meio mínimo essencial de Eagle modificado com sais de Earle (**MEM**)

MEM (Sigma)

Solução de bicarbonato de sódio (Merck) a 7,5%

H₂O bidestilada q.s.p. 1l

O meio mínimo essencial de Eagle modificado com sais de Earle (MEM) é hidratado com 980 ml de água bidestilada e homogeneizado em agitador magnético. Seu pH é ajustado para 7,2 com bicarbonato de sódio a 7,5% (p/v). É colocado em proveta e completado para um litro, com água bidestilada. Novamente, é homogeneizado com auxílio de agitador magnético. Em seguida, adiciona-se soro fetal bovino (Cultilab) na concentração desejada: 2% (v/v) (para os testes de interação com as bactérias) ou 10% (v/v) (para a manutenção da linhagem celular). O pH da solução é novamente checado. Depois, é sucessivamente filtrado sob pressão positiva, através de três filtros: um pré-filtro, outro com poros de 0,45µm e um outro com poros de 0,22µm de diâmetro (filtros da Millipore Corporation).

- Solução de associação de tripsina (0,25% - p/v) - versene (0,02% - p/v) (**ATV**)

É preparada a partir das seguintes soluções:

A. Solução salina:

NaCl (Merck)	8 g
KCl (Merck)	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (Merck)	2,9 g
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,2 g
Água bidestilada	1000 ml
PH 7,4	

Após completa dissolução dos sais, a solução A é submetida à autoclavação a 121°C, durante 20 minutos. É deixada à temperatura de 4°C e utilizada no dia seguinte ao preparo. O volume de 60 ml é separado para o preparo das solução B e C, descritas a seguir.

Solução de tripsina:

Tripsina (Sigma)	2 g
------------------	-----

Solução A (solução salina)	50 ml
----------------------------	-------

A tripsina é dissolvida sob banho de gelo, durante três horas, em 50 ml da solução salina (solução A), com o auxílio de agitador magnético, sendo, posteriormente, filtrada ,através de papel de filtro comum, sobre o restante desta mesma solução.

B. Solução de versene

Versene (Sigma)	0,2 g
-----------------	-------

Solução A (solução salina)	10 ml
----------------------------	-------

O versene é adicionado à solução salina e agitado, em agitador magnético, até ser completamente dissolvido.

C. Preparo final da solução de ATV

As soluções A, B, C e 1,5 ml de solução de vermelho de fenol a 1% (p/v) são misturadas, sob constante agitação em agitador magnético. Em seguida, o pH da solução resultante é ajustado para 7,5 a 7,6, com uma solução de NaOH (1N), e realiza-se a filtração, sob pressão positiva, em filtros Millipore, passando por pré-filtro, a seguir, por filtro com poros de 0,45µm e, por fim, filtro com poros de 0,22µm de diâmetro.

Esta solução é distribuída em frascos de vidros, em alíquotas de 100 ml, que são armazenadas a -20°C. O frasco de uso é mantido a 4°C.

- Solução estoque de **tampão de Sørensen** M/15 - pH 7,3

O tampão de Sørensen M/15 - pH 7,3 é preparado a partir das seguintes soluções:

- Solução A:

KH_2PO_4 (Merck)	0,6356 g.
H_2O bidestilada estéril q.s.p.	70 ml

- Solução B:

Na_2HPO_4 (Merck)	2,3675 g
H_2O bidestilada estéril q.s.p.	70 ml

A solução final é preparada ao se misturar 69,9 ml da solução A com 230 ml da solução B. É homogeneizada e mantida a 4°C, até o momento de uso, quando deve ser diluída na proporção de 1:2 com água destilada, ficando na concentração de M/30, antes de ser misturada aos corantes de May-Grünwald e Giemsa

- Solução de corante de **May-Grünwald** (eosina - azul de metileno segundo May-Grünwald)

A solução comercial do corante de May-Grünwald (Merck) é diluída em solução tampão de Sørensen M/15 - pH 7,3, na proporção de 1:2, e filtrada em papel de filtro comum, no momento de uso.

- Solução de corante de **Giemsa**

A solução de corante de Giemsa (Merck) é diluída em solução tampão de Sørensen M/15 - pH 7,3, na proporção de 1:3, e filtrada em papel de filtro comum, no momento de uso.